



Joana Moreira Loupo

Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Implementação e Validação de um Método
por UPLC para a Determinação de PAH's
nos Óleos Vegetais e Diagnóstico e
Resolução de Problemas Cromatográficos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Paula Allen Lopes, Responsável da Qualidade,
Sovena

Co-orientador: Pedro Simões, Prof. Doutor, FCT

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário Fernando José Eusébio

Arguente: Prof. Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva

Vogal: Eng. Paula Cristina Paleta Allen Revez Dias Lopes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março de 2018

Esta página foi intencionalmente deixada em branco



Joana Moreira Loupo

Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Implementação e Validação de um Método por UPLC para a Determinação de PAH's nos Óleos Vegetais e Diagnóstico e Resolução de Problemas Cromatográficos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março de 2018

“Implementação e Validação de um Método por UPLC para a Determinação de PAH's nos Óleos Vegetais e Diagnóstico e Resolução de Problemas Cromatográficos”, Copyright de Joana Moreira Loupo, FCT-UNL, UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Gostaria de mostrar o meu agradecimento a todas as pessoas que de certa forma, direta ou indiretamente contribuíram não só para o findar desta etapa da minha vida académica, como também para a realização desta dissertação de mestrado.

Em primeiro lugar, agradecer ao Professor Mário Eusébio pelo contacto com a empresa e que tornou possível a realização deste estágio, assim como pelos seus conselhos, ajuda e disponibilidade.

Também à empresa Sovena pela disponibilização de todo o material, equipamento e meios técnicos, necessários à realização deste trabalho. Agradeço à Engenheira Paula Lopes, por me ter aceitado para a realização deste projeto numa empresa de elevado prestígio, assim como pela sua experiência e orientação que me disponibilizou ao longo do meu percurso.

À Engenheira Ana Salvador, minha co-orientadora da empresa, pelo apoio e disponibilidade no decorrer do estágio.

À Engenheira Ana Marques pela sua ajuda, orientação e disponibilidade, ainda que numa parte final do estágio.

A toda a equipa do laboratório pela ajuda, conselhos e simpatia durante o estágio, que de certa forma contribuíram para a sua realização.

Ao Engenheiro António Ferreira, do iBET pela sua indispensável e valiosa ajuda, partilha de conhecimentos e disponibilidade no esclarecimento de qualquer dúvida existente no decorrer do estágio.

Aos engenheiros Filipe Matanço e Sandra Cachopo, por se disponibilizarem em ajudar sempre que surgia algum problema relacionado com o equipamento.

Um agradecimento muito especial à minha mãe por todo o apoio, paciência e ajuda nos momentos menos positivos, porque se cheguei onde agora me encontro, devo-o a ela. Por tudo o que me tem ensinado e todo o conhecimento que me tem transmitido.

Um muito obrigado a todos.

*“The greatest enemy of
knowledge is not ignorance,
it is the illusion of knowledge.”*

Stephen Hawking

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Resumo

O presente trabalho teve como objetivos realizar a validação de um método analítico para a determinação de PAH's nos óleos vegetais, através de cromatografia líquida de ultra-eficiência (UPLC) utilizando o método de padrão interno e diagnosticar e resolver problemas cromatográficos.

Os padrões analisados foram preparados através de diluição de soluções mais concentradas, sendo separados e quantificados através da técnica de cromatografia líquida de ultra-eficiência utilizando uma coluna de fase reversa C18, partículas de 5 µm e dimensões 250x4,6mm, a uma temperatura de 26°C. Foi utilizado um gradiente isocrático, sendo a fase móvel Acetonitrilo, a um fluxo de 1,5 mL/min.

Estes compostos foram detetados por fluorescência, utilizando três canais (B, C e D) com comprimentos de onda de excitação e emissão fixos em $\lambda_{\text{excitação}}=270$ nm e $\lambda_{\text{emissão}}=385$ nm para o canal B, $\lambda_{\text{excitação}}=274$ nm e $\lambda_{\text{emissão}}=507$ nm para o canal C e $\lambda_{\text{excitação}}=292$ nm e $\lambda_{\text{emissão}}=410$ nm para o canal D.

No que diz respeito à validação do método, foram avaliados os parâmetros: curvas de calibração, linearidade, gama de trabalho e limites de detecção e quantificação. Não foi possível obter a precisão e a exatidão do método, tendo em consideração os problemas que foram surgindo no equipamento.

Os resultados da validação mostram que o método é linear segundo os testes de RIKILT, análise de resíduos, teste das áreas normalizadas e de Mandel, para 7 dos 8 PAH's nas suas respetivas gamas de trabalho. Os compostos BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, Db(a,h)A e I(1,2,3-cd)P são lineares nas gamas 0,2 ppb – 2 ppb, 0,3 ppb – 2 ppb, 0,5 ppb – 10 ppb, 0,1 ppb – 10 ppb, 0,3 ppb – 2 ppb, 0,1 ppb – 2 ppb e 0,9 ppb – 10 ppb, respetivamente. Não foi possível obter a gama do composto B(g,h,i)P.

Com o objetivo de obter resultados viáveis e concluir a validação, foi necessário fazer o diagnóstico e resolução de problemas cromatográficos que foram surgindo. Os principais problemas relacionaram-se com diferenças de pressão no sistema, tempos de retenção incorretos, *carryover* e falta de precisão. Assim, para chegar à causa raiz dos problemas com resolução menos direta, foi utilizado o diagrama de Ishikawa (Espinha de Peixe ou Causa/Efeito).

Palavras-Chave: PAH's, SPE, UPLC, óleos vegetais, contaminantes, validação.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Abstract

The purpose of the present work consisted in the validation of an analytical method for the determination of PAH's in vegetable oils, through the use of Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC) using the internal standard method, as well as chromatography troubleshooting.

The standards analyzed were prepared through dilution of concentrated solutions, being separated and quantified through Ultra-Performance Liquid Chromatography using a C18 reverse phase column, 5 μ m particles and dimensions 250x4,6mm, at a temperature of 26°C. It was used an isocratic elution, with 100% Acetonitrile being used as the mobile phase, at a 1,5 mL/min flow.

These compounds were detected by fluorescence, using three channels (B, C and D) with excitation and emission wavelengths fixed at $\lambda_{\text{excitation}}=270$ nm and $\lambda_{\text{emission}}=385$ nm for channel B, $\lambda_{\text{excitation}}=274$ nm and $\lambda_{\text{emission}}=507$ nm for channel C and $\lambda_{\text{excitation}}=292$ nm and $\lambda_{\text{emission}}=410$ nm for channel D.

Regarding the method's validation, the evaluated parameters were: the calibration curves, linearity, working range and limits of detection and quantitation. It was not possible to obtain the method's precision and accuracy, considering the problems that kept arising.

Validation results show that the method is linear, according to RIKILT's test, residual analysis, normalized areas' and Mandel's test, for 7 of the 8 PAH's in their respective working ranges. The compounds BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, Db(a,h)A and I(1,2,3-cd)P are linear on the ranges 0,2 ppb – 2 ppb, 0,3 ppb – 2 ppb, 0,5 ppb – 10 ppb, 0,1 ppb – 10 ppb, 0,3 ppb – 2 ppb, 0,1 ppb – 2 ppb and 0,9 ppb – 10 ppb, respectively. It was not possible to obtain the working range of the compound B(g,h,i)P.

With the aim of obtaining feasible results and conclude the validation, it was necessary to do the diagnosis and resolution of the arising chromatographic problems. The main problems were related to differences in the system pressure, incorrect retention times, *carryover* and lack of precision. Therefore, in order to get to the root cause of the less direct resolution problems, Ishikawa's diagram (Fishbone or Cause/Effect) was used.

Key-Words: PAH's, SPE, UPLC, vegetable oils, contaminants, validation.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Índice

Agradecimentos.....	V
Resumo	VII
Abstract.....	IX
Índice	XI
Índice de Figuras	XIII
Índice de Tabelas	XVII
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	XXI
1. Enquadramento e Motivação	1
2. Introdução	3
2.1. Contaminantes nos Géneros Alimentícios	3
2.2. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAH's).....	3
2.2.1. Toxicidade	5
2.2.2. Exposição aos PAH's	6
2.2.3. Limites Legislativos dos PAH's.....	9
2.3. Óleos Vegetais	11
2.4. Processamento Industrial dos Óleos Vegetais.....	12
2.5. Extração e Quantificação dos PAH's	15
2.5.1. Princípios da Técnica de Extração em Fase Sólida (SPE)	16
2.5.1.1. Polímeros Molecularmente Impressos (MIP's).....	17
2.5.2. Princípios da Técnica de Cromatografia Líquida (UPLC)	18
2.6. Espectroscopia de Fluorescência	20
2.7. Caracterização da Empresa.....	22
2.7.1. História.....	22
2.7.2. Internacionalização.....	23
2.7.3. Organização	23
2.8. Validação da Metodologia Analítica	24
2.8.1. Curva de Calibração	24
2.8.1.1. Gama de Trabalho.....	25
2.8.1.2. Linearidade	26
2.8.2. Limiares Analíticos.....	33
2.8.2.1. Limite de Detecção.....	33
2.8.2.2. Limite de Quantificação	34
2.8.3. Sensibilidade	34
2.8.4. Precisão.....	35
2.8.4.1. Repetibilidade	35

2.8.4.2.	Precisão Intermédia.....	36
2.8.5.	Exatidão.....	37
2.9.	Diagnóstico e Resolução de Problemas (Diagrama de Ishikawa)	38
3.	Materiais e Métodos.....	39
3.1.	Material e Equipamento.....	39
3.2.	Solventes e Reagentes	40
3.3.	Preparação das Soluções – Padrão.....	41
3.4.	Procedimento Experimental a Validar	43
3.5.	Condições Operacionais	44
4.	Resultados e Discussão.....	47
4.1.	Pré-Requisitos	47
4.2.	Validação	51
4.2.1.	Curva de Calibração.....	51
4.2.1.1.	Gama de Trabalho.....	55
4.2.1.2.	Linearidade	56
4.2.2.	Limiares Analíticos.....	95
4.2.2.1.	Limites de Detecção e Quantificação.....	95
4.3.	Identificação de Problemas	96
5.	Conclusões.....	111
6.	Propostas de Trabalho Futuro	113
7.	Referências Bibliográficas.....	115
Anexos.....		119
ANEXO A		119
ANEXO B		121
ANEXO C		126
ANEXO D		134
ANEXO E		143
ANEXO F		146
ANEXO G.....		150

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Estrutura química dos 16 PAH's considerados poluentes prioritários pela EPA ^[adaptado de 9]	4
Figura 2.2 - Exposição aos PAH's ^[15]	6
Figura 2.3 - Níveis de PAH's totais em grupos alimentares, Catalunha, Espanha ^[17]	8
Figura 2.4 - Esquema representativo das etapas de tratamento e extração do óleo ^[22]	12
Figura 2.5 - Esquema representativo das etapas de refino do óleo ^[21]	13
Figura 2.6 - Esquema resumo das etapas de contaminação e remoção dos contaminantes PAH's ^[adaptado de 2]	15
Figura 2.7 - Exemplo das etapas de extração em fase sólida dos componentes de interesse numa mistura ^[adaptado de 33]	17
Figura 2.8 - Formação de MIP's ^[adaptado de 34]	18
Figura 2.9 - Comparação das técnicas HPLC e UPLC ^[adaptado de 35]	19
Figura 2.10 - Componentes essenciais de um espectrómetro de fluorescência ^[adaptado de 38]	20
Figura 2.11 - Representação do diagrama de Jablonski com os espectros de absorção/excitação e emissão (fluorescência) ^[adaptado de 36]	21
Figura 2.12 - Representação do deslocamento de Stokes ^[adaptado de 39]	22
Figura 2.13 - Áreas delimitadas pela função Gaussiana e pelos limites dos n intervalos ^[adaptado de 52]	30
Figura 2.14 - Visualização do aumento da sensibilidade do método de acordo com o declive	35
Figura 4.1 - Cromatograma dos 8 PAH's (10ppb) mais padrão interno (25ppb) com fluxo isocrático 100% Acetonitrilo	48
Figura 4.2 - Parâmetros de eluição por gradiente ^[adaptado de 63]	49
Figura 4.3 - Curva de calibração para o composto BaA	51
Figura 4.4 - Curva de calibração para o composto CHR	52
Figura 4.5 - Curva de calibração para o composto BbF	52
Figura 4.6 - Curva de calibração para o composto BkF	53
Figura 4.7 - Curva de calibração para o composto BaP	53
Figura 4.8 - Curva de calibração para o composto Db(a,h)A	54
Figura 4.9 - Curva de calibração para o composto B(g,h,i)P	54
Figura 4.10 - Curva de calibração para o composto I(1,2,3-cd)P	55
Figura 4.11 - Teste de RIKILT para o composto BaA	57
Figura 4.12 - Teste de RIKILT para o composto CHR	57
Figura 4.13 - Teste de RIKILT para o composto BbF	58
Figura 4.14 - Teste de RIKILT para o composto BkF	59
Figura 4.15 - Teste de RIKILT para o composto BaP	59
Figura 4.16 - Teste de RIKILT para o composto Db(a,h)A	60
Figura 4.17 - Teste de RIKILT para o composto B(g,h,i)P	61
Figura 4.18 - Teste de RIKILT para o composto I(1,2,3-cd)P	61
Figura 4.19 - Gráfico da normalidade dos resíduos do padrão BaA	62
Figura 4.20 - Gráfico com dados normalizados, do padrão BaA, visualização de outliers	63

Figura 4.21 - Gráfico da normalidade dos resíduos do padrão CHR	63
Figura 4.22 - Gráfico com dados normalizados, do padrão CHR, visualização de <i>outliers</i>	64
Figura 4.23 - Gráfico da normalidade dos resíduos do padrão BbF	64
Figura 4.24 - Gráfico com dados normalizados, do padrão BbF, visualização de <i>outliers</i>	65
Figura 4.25 - Gráfico da normalidade dos resíduos do padrão BkF	65
Figura 4.26 - Gráfico com dados normalizados, do padrão BkF, visualização de <i>outliers</i>	66
Figura 4.27 - Gráfico da normalidade dos resíduos do padrão BaP	66
Figura 4.28 - Gráfico com dados normalizados, do padrão BaP, visualização de <i>outliers</i>	67
Figura 4.29 - Gráfico da normalidade dos resíduos do padrão Db(a,h)A	67
Figura 4.30 - Gráfico com dados normalizados, do padrão Db(a,h)A, visualização de <i>outliers</i>	68
Figura 4.31 - Gráfico da normalidade dos resíduos do padrão B(g,h,i)P	68
Figura 4.32 - Gráfico com dados normalizados, do padrão B(g,h,i)P, visualização de <i>outliers</i>	69
Figura 4.33 - Gráfico da normalidade dos resíduos do padrão I(1,2,3-cd)P.....	69
Figura 4.34 - Gráfico com dados normalizados, do padrão I(1,2,3-cd)P, visualização de <i>outliers</i>	70
Figura 4.35 - Gráfico da Independência dos Resíduos para o padrão BaA	83
Figura 4.36 - Gráfico da Independência dos Resíduos para o padrão CHR	83
Figura 4.37 - Gráfico da Independência dos Resíduos para o padrão BbF	84
Figura 4.38 - Gráfico da Independência dos Resíduos para o padrão BkF.....	84
Figura 4.39 - Gráfico da Independência dos Resíduos para o padrão BaP	85
Figura 4.40 - Gráfico da Independência dos Resíduos para o padrão Db(a,h)A.....	85
Figura 4.41 - Gráfico da Independência dos Resíduos para o padrão B(g,h,i)P	86
Figura 4.42 - Gráfico da Independência dos Resíduos para o padrão I(1,2,3-cd)P	86
Figura 4.43 - Visualização dos pistões desgastados (amarelados) e peças com acumulação de partículas	97
Figura 4.44 - Visualização dos desvios nos tempos de retenção para o padrão BaP	98
Figura 4.45 - Visualização das oscilações de pressão para algumas concentrações do padrão BaP.	98
Figura 4.46 - Visualização das diferentes áreas, para a mesma concentração de padrão interno BbC	99
Figura 4.47 - Aumento da pressão ao longo de várias injeções	100
Figura 4.48 - Diagrama de Ishikawa/Espinha de peixe para identificação das possíveis causas do problema ^[66]	103
Figura B.1 - Varrimento ao padrão BbF para determinação do comprimento de onda de emissão ..	121
Figura B.2 - Espectro de emissão do padrão BbF	121
Figura B.3 - Varrimento ao padrão BbF para determinação do comprimento de onda de emissão ..	122
Figura B.4 - Espectro de excitação do padrão BbF	122
Figura B.5 - Gráfico 8 PAH's + padrão interno com canal A modificado	123
Figura B.6 - Gráfico correspondente ao gradiente utilizado inicialmente no método, correspondendo à tabela B.1.....	124
Figura B.7 - Gráfico correspondente ao gradiente final do método, correspondendo à tabela B.2....	124
Figura B.8 - Gráfico correspondente ao método estimado por equações	125
Figura G.1 - Cafeína 1,0 mL/min (coluna PAH's).....	151

Figura G.2 - MeOH 1,0 mL/min (coluna PAH's)	151
Figura G.3 - Cafeína 1,5 mL/min (coluna PAH's).....	152
Figura G.4 - MeOH 1,5 mL/min (coluna PAH's)	152
Figura G.5 - Cafeína 1,0 mL/min (coluna C18)	153
Figura G.6 - MeOH 1,0 mL/min (coluna C18)	153
Figura G.7 - Cafeína 1,5 mL/min (coluna C18)	154
Figura G.8 - MeOH 1,5 mL/min (coluna C18)	154
Figura G.9 - Injeções BaP referentes ao primeiro <i>set</i> (tabela 4.67)	155
Figura G.10 - Injeções ACN intercaladas às injeções do primeiro <i>set</i> (tabela 4.67)	155
Figura G.11 - Injeções BaP referentes ao segundo <i>set</i> (tabela 4.68).....	156
Figura G.12 - Injeções ACN intercaladas às injeções do segundo <i>set</i> (tabela 4.68).....	156
Figura G.13 - Injeções BaP referentes ao terceiro <i>set</i> (tabela 4.69)	157
Figura G.14 - Injeções ACN intercaladas às injeções do terceiro <i>set</i> (tabela 4.69)	157

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Solubilidade, pressão de vapor e pontos de fusão e ebulição dos 8 PAH's ^[10]	4
Tabela 2.2 - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos considerados mutagénicos/genotóxicos pelo SCF 2002 e JECFA em 2005 ^[12]	5
Tabela 2.3 - Teores máximos dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos segundo o Regulamento 1881/2006 ^[18]	9
Continuação da Tabela 2.3 - Teores máximos dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos segundo o Regulamento 1881/2006 ^[18]	10
Continuação da Tabela 2.3 - Teores máximos dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos segundo o Regulamento 1881/2006 ^[18]	11
Tabela 2.4 - Tabela para aplicação do teste de Kolmogorov-Smirnov	29
Tabela 2.5 - Exemplo de k=4 intervalos a escolher para o cálculo das medidas observadas	30
Tabela 4.1 - Áreas dos 8 PAH's (10ppb) mais padrão interno (25ppb)	48
Tabela 4.2 - Gama de trabalho dos 8 PAH's.....	56
Tabela 4.3 - Valores do teste de RIKILT para o padrão BaA.....	56
Tabela 4.4 - Valores do teste de RIKILT para o padrão CHR.....	57
Tabela 4.5 - Valores do teste de RIKILT para o padrão BbF	58
Tabela 4.6 - Valores do teste de RIKILT para o padrão BkF	58
Tabela 4.7 - Valores do teste de RIKILT para o padrão BaP.....	59
Tabela 4.8 - Valores do teste de RIKILT para o padrão Db(a,h)A	60
Tabela 4.9 - Valores do teste de RIKILT para o padrão B(g,h,i)P	60
Tabela 4.10 - Valores do teste de RIKILT para o padrão I(1,2,3-cd)P	61
Tabela 4.11 - Teste de Kolmogorov – Smirnov para o padrão BaA	71
Tabela 4.12 - Teste do Qui-Quadrado para o padrão BaA	71
Tabela 4.13 - Teste de Kolmogorov – Smirnov para o padrão CHR	72
Tabela 4.14 - Teste do Qui-Quadrado para o padrão CHR	72
Tabela 4.15 - Teste de Kolmogorov – Smirnov para o padrão BbF.....	73
Tabela 4.16 - Teste do Qui-Quadrado para o padrão BbF	73
Tabela 4.17 - Teste de Kolmogorov – Smirnov para o padrão BkF.....	74
Tabela 4.18 - Teste do Qui-Quadrado para o padrão BkF	75
Tabela 4.19 - Teste de Kolmogorov – Smirnov para o padrão BaP	76
Tabela 4.20 - Teste do Qui-Quadrado para o padrão BaP	77
Tabela 4.21 - Teste de Kolmogorov – Smirnov para o padrão Db(a,h)A.....	78
Tabela 4.22 - Teste do Qui-Quadrado para o padrão Db(a,h)A	79
Tabela 4.23 - Teste de Kolmogorov – Smirnov para o padrão B(g,h,i)P	80
Tabela 4.24 - Teste do Qui-Quadrado para o padrão B(g,h,i)P.....	81
Tabela 4.25 - Teste de Kolmogorov – Smirnov para o padrão I(1,2,3-cd)P	81
Tabela 4.26 - Teste do Qui-Quadrado para o padrão I(1,2,3-cd)P	82
Tabela 4.27 - Tabela resumo dos valores de D e Dcrítico para o teste de Kolmogorov-Smirnov	82

Tabela 4.28 - Tabela resumo dos valores de χ^2 para o teste do Qui-Quadrado.....	82
Tabela 4.29 - Teste de Cochran para o padrão BaA	87
Tabela 4.30 - Teste de Cochran para o padrão CHR	87
Tabela 4.31 - Teste de Cochran para o padrão BbF	87
Tabela 4.32 - Teste de Cochran para o padrão BkF.....	88
Tabela 4.33 - Teste de Cochran para o padrão BaP	88
Tabela 4.34 - Teste de Cochran para o padrão Db(a,h)A.....	89
Tabela 4.35 - Teste de Cochran para o padrão B(g,h,i)P	89
Tabela 4.36 - Teste de Cochran para o padrão I(1,2,3-cd)P	90
Tabela 4.37 - Tabela resumo dos valores de C e Ccrítico para o teste de Cochran.....	90
Tabela 4.38 - Teste das áreas normalizadas para o padrão BaA.....	91
Tabela 4.39 - Teste das áreas normalizadas para o padrão CHR.....	91
Tabela 4.40 - Teste das áreas normalizadas para o padrão BbF	91
Tabela 4.41 - Teste das áreas normalizadas para o padrão BkF	92
Tabela 4.42 - Teste das áreas normalizadas para o padrão BaP	92
Tabela 4.43 - Teste das áreas normalizadas para o padrão Db(a,h)A	92
Tabela 4.44 - Teste das áreas normalizadas para o padrão B(g,h,i)P	93
Tabela 4.45 - Teste das áreas normalizadas para o padrão I(1,2,3-cd)P	93
Tabela 4.46 - Resultados finais do Teste de Mandel para o composto BaA	93
Tabela 4.47 - Resultados finais do Teste de Mandel para o composto CHR	94
Tabela 4.48 - Resultados finais do Teste de Mandel para o composto BbF	94
Tabela 4.49 - Resultados finais do Teste de Mandel para o composto BkF	94
Tabela 4.50 - Resultados finais do Teste de Mandel para o composto BaP	94
Tabela 4.51 - Resultados finais do Teste de Mandel para o composto Db(a,h)A	94
Tabela 4.52 - Resultados finais do Teste de Mandel para o composto B(g,h,i)P	94
Tabela 4.53 - Resultados finais do Teste de Mandel para o composto I(1,2,3-cd)P	95
Tabela 4.54 - Tabela resumo do teste de Mandel	95
Tabela 4.55 - Limites de Detecção e Quantificação para os oito PAH's	96
Tabela 4.56 - Injeções de 2 ppb de BaA	101
Tabela 4.57 - Injeções de 2 ppb de BaP	101
Tabela 4.58 - Injeções de 0,1 ppb de Db(a,h)A	102
Tabela 4.59 - Injeções de 5 ppb de B(g,h,i)P	102
Tabela 4.60 - Injeções de 1 ppb de BaP com a coluna "velha"	104
Tabela 4.61 - Injeções de 0,3 ppb de BaP com a coluna "velha"	104
Tabela 4.62 - Injeções de 2 ppb de BaA com coluna nova da Waters	105
Tabela 4.63 - Injeções de 0,2 ppb de BaA com coluna nova da Waters	105
Tabela 4.64 - Injeções de 2 ppb de BaP com coluna SupelCo.....	106
Tabela 4.65 - Injeções de cafeína com detetor de díodos para despiste do detetor de fluorescência, com coluna PAH's	107
Tabela 4.66 - Injeções de cafeína com detetor de díodos para despiste do detetor de fluorescência, com coluna C18.....	108

Tabela 4.67 - Primeiro <i>set</i> para verificação de <i>carryover</i>	109
Tabela 4.68 - Segundo <i>set</i> para verificação de <i>carryover</i>	109
Tabela 4.69 - Terceiro <i>set</i> para verificação de <i>carryover</i>	109
Tabela 6.1 - Diferença de condições operacionais entre duas colunas	113
Tabela A.1 - Valores críticos da distribuição D de estatística Lilliefors	119
Tabela A.2 - Valores críticos para o teste de Cochran, nível de significância 5% ^[69]	120
Tabela B.1 - Gradiente utilizado inicialmente no método.....	123
Tabela B.2 - Gradiente final utilizado no método	123
Tabela B.3 - Gradiente estimado por equações	125
Tabela C.1 - Dados para a construção da curva de calibração do padrão BaA.....	126
Tabela C.2 - Dados para a construção da curva de calibração do padrão CHR.....	127
Tabela C.3 - Dados para a construção da curva de calibração do padrão BbF	128
Tabela C.4 - Dados para a construção da curva de calibração do padrão BkF	129
Tabela C.5 - Dados para a construção da curva de calibração do padrão BaP	130
Tabela C.6 - Dados para a construção da curva de calibração do padrão Db(a,h)A	131
Tabela C.7 - Dados para a construção da curva de calibração do padrão B(g,h,i)P	132
Tabela C.8 - Dados para a construção da curva de calibração do padrão I(1,2,3-cd)P	133
Tabela D.1 - Dados utilizados para análise de resíduos BaA.....	135
Tabela D.2 - Dados utilizados para análise de resíduos CHR.....	136
Tabela D.3 - Dados utilizados para análise de resíduos BbF	137
Tabela D.4 - Dados utilizados para análise de resíduos BkF	138
Tabela D.5 - Dados utilizados para análise de resíduos BaP	139
Tabela D.6 - Dados utilizados para análise de resíduos Db(a,h)A	140
Tabela D.7 - Dados utilizados para análise de resíduos B(g,h,i)P.....	141
Tabela D.8 - Dados utilizados para análise de resíduos I(1,2,3-cd)P	142
Tabela E.1 - Tabela com dados utilizados no teste de Mandel para o composto BaA	143
Tabela E.2 - Tabela com dados utilizados no teste de Mandel para o composto CHR	143
Tabela E.3 - Tabela com dados utilizados no teste de Mandel para o composto BbF.....	143
Tabela E.4 - Tabela com dados utilizados no teste de Mandel para o composto BkF	144
Tabela E.5 - Tabela com dados utilizados no teste de Mandel para o composto BaP	144
Tabela E.6 - Tabela com dados utilizados no teste de Mandel para o composto Db(a,h)A	144
Tabela E.7 - Tabela com dados utilizados no teste de Mandel para o composto B(g,h,i)P	145
Tabela E.8 - Tabela com dados utilizados no teste de Mandel para o composto I(1,2,3-cd)P	145
Tabela F.1 - Tabela utilizada na construção da gama de trabalho do composto BaA	146
Tabela F.2 -Tabela utilizada na construção da gama de trabalho do composto CHR	146
Tabela F.3 - Tabela utilizada na construção da gama de trabalho do composto BbF	147
Tabela F.4 - Tabela utilizada na construção da gama de trabalho do composto BkF.....	147
Tabela F.5 -Tabela utilizada na construção da gama de trabalho do composto BaP	148
Tabela F.6 - Tabela utilizada na construção da gama de trabalho do composto Db(a,h)A.....	148
Tabela F.7 - Tabela utilizada na construção da gama de trabalho do composto B(g,h,i)P	149
Tabela F.8 - Tabela utilizada na construção da gama de trabalho do composto I(1,2,3-cd)P	149

Tabela G.1 - Resumo de problemas, por ordem cronológica	150
Tabela G.2 - Primeiro <i>set</i> de injeções de verificação.....	158
Tabela G.3 - Segundo <i>set</i> de injeções de verificação.....	158
Tabela G.4 - Terceiro <i>set</i> de injeções de verificação.....	159
Tabela G.5 - Quarto <i>set</i> de injeções de verificação	159
Tabela G.6 - Quinto <i>set</i> de injeções de verificação	160
Tabela G.7 - Sexto <i>set</i> de injeções de verificação.....	160
Tabela G.8 - Sétimo <i>set</i> de injeções de verificação.....	161
Tabela G.9 - Oitavo <i>set</i> de injeções de verificação.....	161
Tabela G.10 - Nono <i>set</i> de injeções de verificação	162
Tabela G.11 - Décimo <i>set</i> de injeções de verificação.....	162
Tabela G.12 – Décimo-primeiro <i>set</i> de injeções de verificação.....	163
Tabela G.13 - Décimo-segundo <i>set</i> de injeções de verificação.....	163
Tabela G.14 - Décimo-terceiro <i>set</i> de injeções de verificação.....	164

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

3-MCPD	3-monochloropropane-1,2-diol
ACN	Acetonitrilo
ALARA	As Low As Reasonably Achieved
B(a)A	Benzo(a)Antraceno
B(a)P	Benzo(a)Pireno
B(b)C	Benzo(b)Criseno
B(b)F	Benzo(b)Fluoranteno
B(ghi)P	Benzo(g,h,i)Perileno
B(k)F	Benzo(k)Fluoranteno
CHR	Criseno
Db(ah)A	Dibenzo(a,h)Antraceno
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (designação anglo-saxónica)
EU	União Europeia (designação anglo-saxónica)
FLD	Detetor de Fluorescência
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (designação anglo-saxónica)
I(123cd)P	Indeno(1,2,3-cd)Pireno
IARC	Agência Internacional de Investigação sobre o Cancro (designação anglo-saxónica)
L.D.	Limite de Detecção
L.Q.	Limite de Quantificação
PAH's	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (designação anglo-saxónica)
PCB's	Bifenilos Policlorados (designação anglo-saxónica)
P.I.	Padrão Interno
SCF	Comité Científico dos Alimentos (designação anglo-saxónica)
SPE	Extração em Fase Sólida (designação anglo-saxónica)
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência (designação anglo-saxónica)
U.S. EPA	Agência de Proteção Ambiental (designação anglo-saxónica)

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

1. Enquadramento e Motivação

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos – PAH's – são uma classe de compostos orgânicos constituídos por dois ou mais anéis aromáticos condensados de átomos de carbono e hidrogénio. A sua origem provém de fontes naturais ou antropogénicas, encontrando-se presentes na água, solo e ar. A maior contribuição em termos de contaminação destes compostos é através do ar e da ingestão de alimentos. Estes compostos são cancerígenos, sendo considerados poluidores prioritários, de modo que a sua presença deve ser controlada em diversos géneros alimentícios, incluindo os óleos vegetais. Deste modo, a quantidade destes contaminantes deve ser mantida dentro dos limites estabelecidos, implementados pelo Regulamento da Comissão (EC) No 1881/2006.

De momento, existem limites para 4 PAH's - Benzo(a)Pireno, Benzo(a)Antraceno, Benzo(b)Fluoranteno e Criseno - nos géneros alimentícios, mas sabe-se que atualmente são 8 os PAH's considerados genotóxicos. Estudos indicam que os níveis atualmente avaliados, de Benzo(a)Pireno e da soma dos 4 PAH's, não refletem a ocorrência dos 8 PAH's genotóxicos nos óleos vegetais e gorduras^[1], pelo que a sua presença deve ser avaliada, sendo estes os compostos estudados neste trabalho: Benzo(a)Antraceno, Criseno, Benzo(b)Fluoranteno, Benzo(k)Fluoranteno, Benzo(a)Pireno, Indeno(1,2,3-cd)Pireno, Ibenzo(a,h)Antraceno e Benzo(g,h,i)Perileno^[2].

Sendo a Sovena uma empresa produtora de óleos vegetais, surgiu como objetivo deste trabalho a implementação e validação de um método analítico para a quantificação dos 8 PAH's referidos anteriormente, no óleo refinado, de modo a garantir que estes contaminantes se encontram dentro dos limites considerados aceitáveis, caso, futuramente o número de PAH's sujeitos a limites for aumentado de quatro para oito.

De modo a ser determinada a presença e concentração destes compostos, são utilizadas técnicas como a extração em fase sólida utilizando cartuchos de polímeros com impressão molecular com o objetivo de isolar os PAH's, seguida de uma análise em UPLC com detetor de fluorescência (FLD) de modo a separar e quantificar os diferentes PAH's da mistura. Normalmente é usado o padrão Benzo(b)Criseno para o método da adição de padrão interno, seguindo-se o guia Relacre para a validação do método estudado.

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações suscetíveis de acumular erros (sistemáticos e/ou aleatórios), sendo essencial aos laboratórios obterem resultados credíveis. Para tal, deve ser feita uma validação, que consiste na confirmação, através de fornecimento de provas objetivas, que os requisitos para certa aplicação ou uso específico pretendido, foram cumpridos^[3].

O equipamento UPLC é um equipamento sensível que muitas das vezes dá origem a problemas que requerem uma resolução estruturada para chegar à sua causa raiz. É, deste modo, necessário a utilização de ferramentas, tais como os 5 porquês, metodologia A3, standard work, diagrama de Ishikawa, entre outras, que permitam chegar às principais causas que afetam os problemas, quando

estas não são as mais óbvias, ou as que diretamente se relacionam, tornando-se mais complicado encontrar a fonte do problema.

Os problemas devem ser rapidamente diagnosticados e resolvidos de modo a não haver paragens no trabalho (o que implica perda de tempo e custos para a empresa) e ser possível a sua continuação e obtenção de resultados viáveis.

2. Introdução

2.1. Contaminantes nos Géneros Alimentícios

Muitos dos alimentos estão sujeitos a algum tipo de contaminação, quer seja pela maneira como são processados, quer seja através do ambiente, através da utilização de pesticidas ou mesmo no seu transporte e armazenamento. Consideram-se como contaminantes, substâncias que não foram intencionalmente adicionadas a um género alimentício, mas que nele estejam presentes como resultado dos vários processos por que passa, desde a sua produção até ao seu armazenamento^[4].

Contaminantes que são formados durante o processamento de alimentos, não se encontram presentes na matéria-prima, não sendo possível evitar totalmente a sua presença ao longo deste processo. Ainda assim, processos tecnológicos, mais à frente descritos, podem ser ajustados e/ou otimizados de modo a reduzir os níveis destes contaminantes formados durante o processamento de alimentos^[5].

Com vista a assegurar que os alimentos que são colocados no mercado são seguros para ingestão e não contêm contaminantes a níveis que possam apresentar ameaça à saúde humana, foram tomadas medidas (estabelecimento de níveis máximos) pela União Europeia para os seguintes contaminantes: micotoxinas, metais, dioxinas e PCB's, PAH's, 3-MCPD, melamina, ácido erúico e nitratos^[6].

2.2. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAH's)

Dentro dos contaminantes alimentares, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH's) são uma classe de mais de 100 compostos orgânicos diferentes, constituídos por dois ou mais anéis aromáticos condensados de átomos de carbono e hidrogénio, dividindo-se em leves e pesados. Os PAH's considerados leves, são constituídos por até quatro anéis de benzeno, ao passo que os denominados pesados são constituídos por mais de quatro anéis de benzeno.

Estes compostos entram no ambiente através de várias fontes e são normalmente encontrados como uma mistura contendo dois ou mais destes compostos^[7]. Alguns PAH's são fabricados industrialmente, apresentando-se como sólidos sem cor, brancos ou amarelo claro^[8].

Os PAH's podem ser formados durante processos biológicos ou como produtos de combustão incompleta, quer de fontes naturais de combustão (incêndios florestais) ou combustão provocada pelo Homem (emissões de automóveis e fumo de cigarro). Deste modo, os PAH's são normalmente detetados na atmosfera, solo e água^[7].

Muitos destes compostos são cancerígenos, de modo que a sua presença deve ser controlada em diversos alimentos, incluindo as gorduras e os óleos alimentares. Na figura 2.1 estão representados os 16 PAH's considerados poluentes prioritários pela EPA.

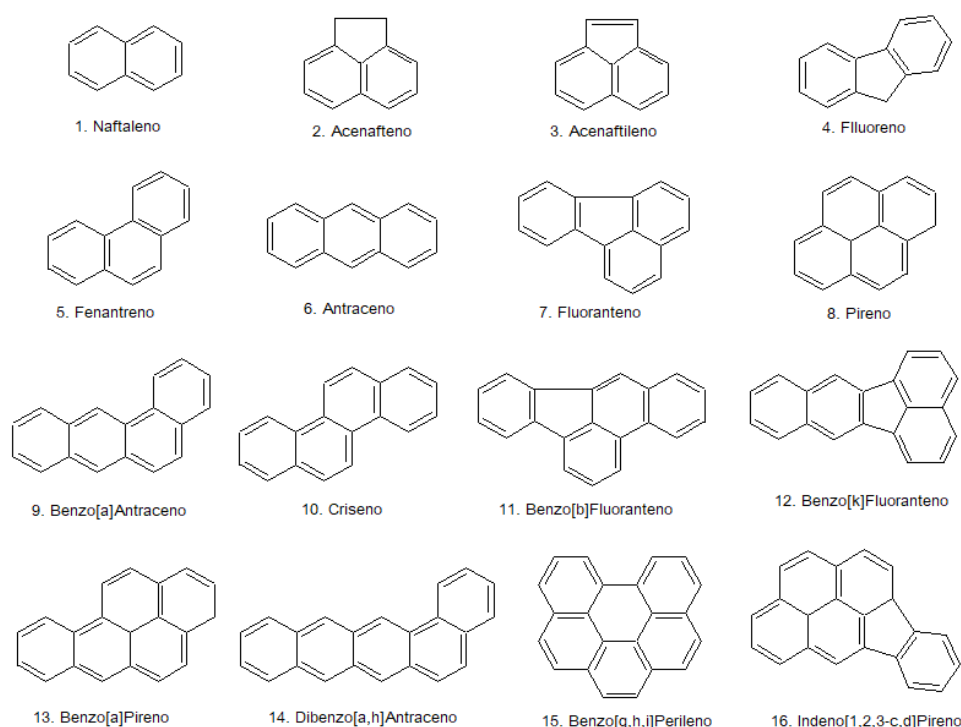


Figura 2.1 - Estrutura química dos 16 PAH's considerados poluentes prioritários pela EPA^[adaptado de 9]

As caraterísticas gerais dos PAH's são o seu elevado ponto de fusão e ebulição (daí apresentarem-se como sólidos), baixa pressão de vapor e baixa solubilidade em água como se verifica pelos dados da tabela 2.1. As últimas duas caraterísticas (pressão de vapor e solubilidade em água) tendem a diminuir com o aumento do peso molecular. Por cada anel adicional, a solubilidade em água destes compostos, diminui. Por outro lado, os PAH's são muito solúveis em solventes orgânicos por serem altamente lipofílicos. Estes também apresentam várias funções como: condutividade, sensibilidade à luz e resistência ao calor e à corrosão^[7].

Tabela 2.1 - Solubilidade, pressão de vapor e pontos de fusão e ebulição dos 8 PAH's^[10]

Composto	Solubilidade em água (25°C) (mg/L)	Pressão de vapor (25°C) (mmHg)	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C)
BaA	9,4E-03	2,10E-07	162	438
CHR	2,0E-03	6,23E-09	255	448
BbF	1,2E-03*	5,00E-07 (20°C)	168	481
BkF	8,0E-04	9,65E-10	217	480
BaP	1,6E-03	5,49E-09	179	496
Db(ah)A	6,3E-04	9,55E-10	267	524
B(ghi)P	2,6E-04	1,00E-10	278	550
I(123cd)P	1,9E-04	1,25E-10	164	530

*Temperatura não especificada

Os PAH's possuem um espectro de absorção UV muito característico. Cada anel tem um espectro UV único, portanto, cada isômero tem um espectro de absorção diferente. A maioria dos PAH's é fluorescente, emitindo comprimentos de onda característicos quando excitados (quando as moléculas absorvem luz), apresentando-se esta característica especialmente útil na identificação dos PAH's^[7].

2.2.1. Toxicidade

Estudos em animais, utilizando PAH's individuais, mostraram vários efeitos toxicológicos, tais como: imunotoxicidade, toxicidade reprodutiva, hematológica e de desenvolvimento, principalmente para o Benzo(a)Pireno. Apesar disso, é o seu potencial carcinogénico e genotóxico (prejudicial ao DNA) que causa maior preocupação. Diversos PAH's mostraram apresentar carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade *in vitro* e *in vivo*. Em 2002, foi feita uma avaliação de risco pelo Comité Científico dos Alimentos (SCF) em 33 PAH's, chegando à conclusão que 15 deles (e adicionalmente o Benzo[c]Fluoreno como sugerido pela JECFA em 2005^[11]), listados na tabela 2.2, apresentavam clara evidência de mutagenicidade/toxicidade em células somáticas em experiências realizadas em animais *in vivo*^[12].

Tabela 2.2 - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos considerados mutagénicos/genotóxicos pelo SCF 2002 e JECFA em 2005^[12]

Nomenclatura habitual	Nomenclatura CAS	Nº de registo CAS	Abreviatura
Benz[a]anthracene	Benz[a]anthracene	56-55-3	BaA
Benzo[b]fluoranthene	Benz[e]acephenanthrylene	205-99-2	BbFA
Benzo[b]fluorene	Benzo[b]fluorene*	205-12-9	BbF*
Benzo[j]fluoranthene	Benzo[j]fluoranthene	205-82-3	BjFA
Benzo[k]fluoranthene	Benzo[k]fluoranthene	207-08-9	BkFA
Benzo[ghi]perylene	Benzo[ghi]perylene	191-24-2	BghiP
Benzo[a]pyrene	Benzo[a]pyrene	50-32-8	BaP
Chrysene	Chrysene	218-01-9	CHR
Cyclopenta[cd]pyrene	Cyclopenta[cd]pyrene	27208-37-3	CPP
Dibenz[a,h]anthracene	Dibenz[a,h]anthracene	53-70-3	DBahA
Dibenzo[a,e]pyrene	Naphto[1,2,3,4-def]chrysene	192-65-4	DBaeP
Dibenzo[a,h]pyrene	Dibenzo[b,def]chrysene	189-64-0	DBahP
Dibenzo[a,i]pyrene	Benzo[rst]pentaphene	189-55-9	DBaiP
Dibenzo[a,l]pyrene	Dibenzo[def,p]chrysene	191-30-0	DBalP
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	Indeno[1,2,3-cd]-pyrene	193-39-5	IP
5-Methylchrysene	Chrysene, 5-methyl-	3697-24-3	5-MCH

*dado incerto

Mais tarde, a Agência Internacional de Investigação sobre o Cancro (IARC), em 2012, concluiu que o Benzo(a)Pireno é carcinogénico para o ser humano. Outros sete PAH's também foram identificados

como sendo prováveis carcinogênicos a humanos: Benzo(a)Antraceno, Benzo(a)Pireno, Benzo(b)Fluoranteno, Benzo(k)Fluoranteno, Criseno, Dibenzo(a,h)Antraceno e Indeno(1,2,3-cd)Pireno^[13].

Apesar de apenas o Benzo(a)Pireno ser o único usado como marcador de contaminação, os 16 compostos considerados poluidores prioritários pelos regulamentos da Comunidade Europeia e U.S. EPA^[14] devem ser tidos em conta como potencialmente genotóxicos e carcinogênicos para humanos, de maneira que foi recomendado pelo Comitê Científico dos Alimentos que os níveis dos PAH's fossem reduzidos para valores tão baixos quanto razoavelmente alcançados (princípio ALARA).

2.2.2. Exposição aos PAH's

Conforme foi dito anteriormente, sabe-se que muitos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH's) apresentam carcinogenicidade em animais e seres humanos. Deste modo, é necessário um melhor conhecimento da sua formação e comportamento no meio ambiente, assim como as suas principais fontes de modo a reduzir os seus níveis e consequentemente os riscos associados à saúde humana.

Estes compostos são formados durante processos de combustão incompleta ou incineração da matéria orgânica, podendo formar-se através de causas naturais, na sequência de fogos florestais ou erupções vulcânicas, ou através de causas antropogênicas, em processos industriais ou no processamento e preparação de alimentos. Para a população em geral, a maior fonte de exposição dos PAH's para não fumadores é através da ingestão de alimentos e da inalação de ar^[12]. Através da figura 2.2 é possível ver as maiores fontes de exposição aos PAH's.

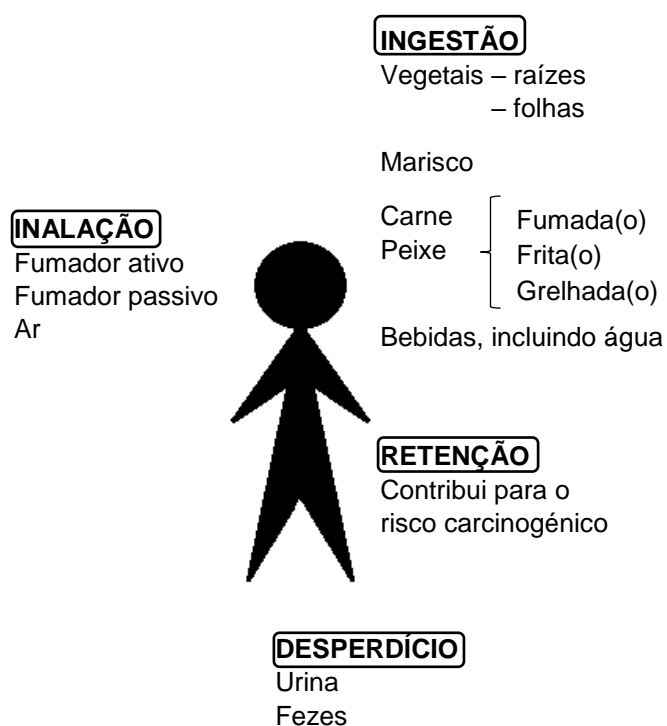


Figura 2.2 - Exposição aos PAH's^[15]

Os PAH's são emitidos a partir de diversas fontes ambientais, como o processamento de carvão, óleo bruto, petróleo, gás natural, produção de alumínio, ferro e aço, aquecimento em centrais de energia e residências (óleo, gás, fogões a carvão, fogões a lenha), combustão de lixo, fogos, gases de exaustão e óleo usado de lubrificação de motores. Os solos e águas superficiais também podem ser contaminados por PAH's devido a precipitações atmosféricas, escoamento urbano, deposição de esgotos e certas perdas, como derramamento de gasolina e óleo, levando, como resultado, à contaminação de animais e culturas alimentícias^[12].

No processamento e preparação de alimentos, os PAH's podem formar-se durante processos que envolvam fumaça, aquecimento, secagem (processos industriais) e ainda grelhados, ou outros processos idênticos – tostar, torrar, assar, etc. (preparação de alimentos em casa). Processos de secagem que envolvam contacto direto com fogo e processos de aquecimento (tratamento térmico) usados durante a produção de alguns óleos de origem vegetal, podem originar elevados níveis de PAH's nestes, por contacto das sementes com os gases de combustão^[14,16]. Por outro lado, grande parte destes contaminantes são removidos em processos posteriores da refinação do óleo, como a desodorização, que remove PAH's leves e o branqueamento que remove PAH's pesados^[2]. Ainda assim, métodos alternativos que evitam a formação inicial de PAH's devem ser usados sempre que possível. Os vegetais podem ficar contaminados através da deposição de partículas no ar, ou por crescerem em solo contaminado. Carne mal cozinhada, leite, aves e ovos, normalmente não contêm níveis elevados de PAH's devido ao rápido metabolismo destes compostos nos animais dos quais estes alimentos são produzidos. Contudo, alguns animais marinhos como moluscos bivalves (mexilhões, ostras, etc.), são conhecidos por absorver e acumular PAH's de águas contaminadas^[12].

Em 2008, a EFSA calculou a exposição dietética humana aos PAH's com base nos dados fornecidos por 17 países europeus, incluindo a Irlanda. A exposição variava de 235 ng/dia até 389 ng/dia para médios e grandes consumidores, respetivamente, apenas para o benzo(a)pireno, enquanto que para a soma dos oito PAH's mais críticos, uma exposição de 1729 ng/dia e 3078 ng/dia para médios e grandes consumidores, respetivamente. Chegou-se à conclusão que os dois maiores contribuidores para a exposição dietética eram os cereais e os alimentos feitos de cereais, mariscos e alimentos feitos de marisco. É de notar, no entanto, que poucos dados estavam disponíveis em alimentos com conteúdo potencialmente elevado de PAH's, tais como, carne assada, fumada e grelhada. Nos mariscos, os PAH's estão associados com moluscos e produtos processados, como peixe fumado^[12].

Por outro lado, no ano de 2006 em Espanha foi realizado um estudo dos níveis de PAH's em diversos géneros alimentícios e que demonstrou que grande parte dos PAH's se encontram presentes nas carnes e derivados, nos cereais e nos óleos e gorduras^[17], como se verifica através do gráfico da figura 2.3.

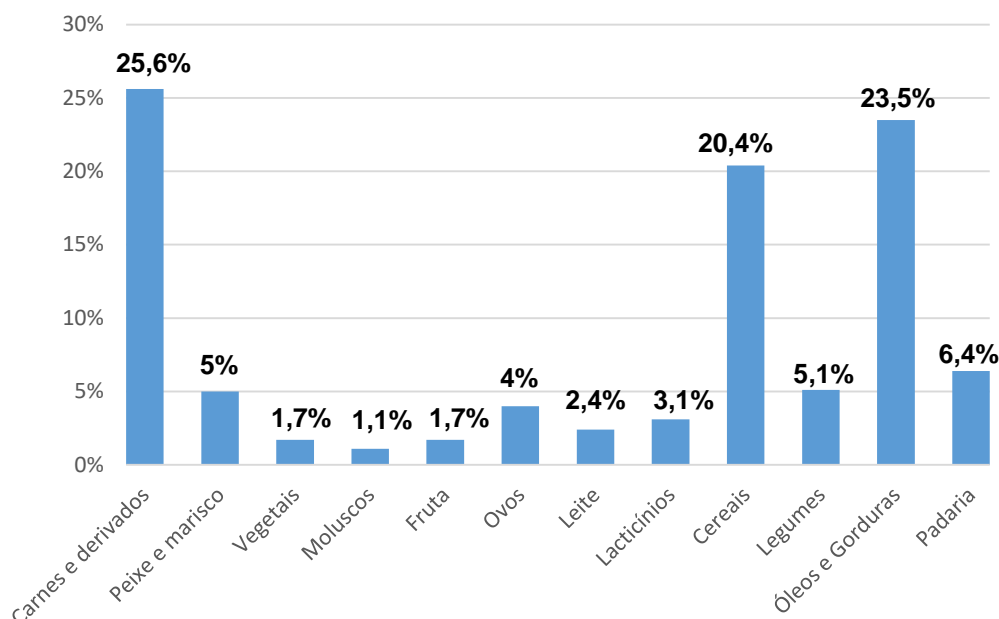


Figura 2.3 - Níveis de PAH's totais em grupos alimentares, Catalunha, Espanha^[17]

Ainda assim, apesar da alimentação ser uma das fontes principais de contaminação de PAH's para o ser humano, estes contaminantes são ingeridos em quantidades muito pequenas, havendo um risco muito baixo de contaminação por ingestão.

Por outro lado, a contaminação atmosférica dos PAH's depende de alguns fatores. Conforme o seu tamanho e em caso de ausência de precipitação, o tempo de permanência na atmosfera dos PAH's é maior ou menor, variando desde alguns dias, até 4-6 semanas, para partículas mais pequenas que 1 μm de diâmetro, mas apenas uns dias ou menos de um dia, para partículas entre 1-10 μm de diâmetro, até se degradarem. Com precipitação, o seu tempo de residência na atmosfera é provavelmente reduzido. Um estudo revelou que em relação à degradação do BaP em águas naturais, esta vai depender da sua profundidade, radiação solar, temperatura e oxigénio dissolvido. Assim, a taxa de degradação será mais elevada nas camadas superiores da água, e vai descendo em profundidade devido à reduzida clareza da água, reduzida iluminação, temperatura e concentração de oxigénio. É de esperar que por exemplo em lagos e rios a decomposição dos PAH's seja muito pobre por haver falta de iluminação e oxigénio^[15].

O processo de decomposição dos PAH's consiste em oxidação física e redução biológica. Quantitativamente, o processo mais importante é a foto-oxidação, tanto na atmosfera como em ambiente aquático. Outros processos físicos de decomposição destes compostos que ocorram na água ou em estações de tratamento de água são: oxidação com ozono, dióxido de cloro ou outros compostos clorados. Por outro lado, já foi reportada ingestão por organismos aquáticos, seguida de biodegradação^[15].

Até ao início do presente século, era assumido que existia um balanço natural entre a produção e degradação de PAH's. Contudo, com o crescimento do desenvolvimento industrial em diversas partes

do mundo, esse balanço está a ser perturbado, levando ao constante crescimento da taxa de produção de PAH's, enquanto que a sua taxa de decomposição permanece mais ou menos constante^[15].

2.2.3. Limites Legislativos dos PAH's

Atualmente existem limites máximos estabelecidos pelo Regulamento da Comissão (EC) No 1881/2006, para a quantidade de quatro PAH's, considerados, pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar – EFSA, os principais indicadores de contaminação deste grupo de contaminantes, nos diversos géneros alimentícios. Nos óleos e nas gorduras, a quantidade de benzo(a)pireno não pode exceder os 2 µg/kg enquanto que a soma de outros quatro PAH's – benzo(a)pireno, benz(a)antraceno, benz(b)fluoranteno e criseno – não pode exceder os 10 µg/kg, como se verifica pela tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Teores máximos dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos segundo o Regulamento 1881/2006^[18]

Géneros alimentícios		Teores máximos (µg/kg)	
6.1		Benzo(a)pireno	Soma de benzo(a)pireno, benz(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno e criseno
6.1.1	Óleos e gorduras (com exceção da manteiga de cacau e do óleo de coco) destinados ao consumo humano direto ou à utilização como ingredientes alimentares	2,0	10,0
6.1.2	Grãos de cacau e produtos derivados	5,0 µg/kg de gordura a partir de 1.4.2013	35,0 µg/kg de gordura a partir de 1.4.2013 até 31.3.2015 30,0 µg/kg de gordura a partir de 1.4.2015
6.1.3	Óleo de coco destinado ao consumo humano direto ou como ingrediente alimentar	2,0	20,0
6.1.4	Carne fumada e produtos à base de carne fumada	5,0 até 31.8.2014	30,0 a partir de 1.9.2012 até 31.8.2014

		2,0 a partir de 1.9.2014	12,0 a partir de 1.9.2014
6.1.5	Parte comestível de peixe fumado e produtos da pesca fumados, com exceção dos produtos da pesca enumerados nos pontos 6.1.6 e 6.1.7. Para os crustáceos fumados, o teor máximo aplica-se à parte comestível dos apêndices e do abdómen. No caso dos caranguejos e crustáceos similares (<i>Brachyura</i> e <i>Anomura</i>) fumados, aplica-se à parte comestível dos apêndices	5,0 até 31.8.2014 2,0 a partir de 1.9.2014	30,0 a partir de 1.9.2012 até 31.8.2014 12,0 a partir de 1.9.2014
6.1.6	Espadilhas fumadas e espadilhas fumadas em lata (<i>sprattus sprattus</i>); moluscos bivalves (frescos refrigerados ou congelados); carne tratada termicamente e produtos à base de carne tratada termicamente vendidos ao consumidor final	5,0	30,0
6.1.7	Moluscos bivalves (fumados)	6,0	35,0
6.1.8	Alimentos transformados à base de cereais e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens	1,0	1,0
6.1.9	Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição, incluindo leite para bebés e leite de transição	1,0	1,0

6.1.10	Alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos, especificamente destinados a lactentes	1,0	1,0
--------	---	-----	-----

Chegou-se à conclusão que não devem ser estudados apenas quatro PAH's mas sim um conjunto de dezasseis. Entre esses, oito apresentam elevado potencial cancerígeno e a sua presença deve ser avaliada^[14]: benz(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenz(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno^[19].

Segundo o regulamento (EC) No 1881/2006, os níveis máximos dos PAH's devem ser seguros e tão baixos quanto razoavelmente alcançável (ALARA), baseados em boas práticas de fabricação, agricultura e pesca^[12].

De modo a determinar a presença e concentração dos PAH's nos óleos vegetais são utilizadas técnicas como a extração em fase sólida, com o objetivo de isolar os PAH's, seguida de uma análise em UPLC de modo a separar e quantificar os diferentes PAH's da mistura.

2.3.Óleos Vegetais

Óleos vegetais são óleos naturais, extraídos, na sua maioria, de sementes de plantas. Estes podem também ser extraídos de nozes e certos frutos. Os óleos mais utilizados são o óleo de colza, côco, milho, algodão, azeitona, palma, amendoim, açafrão, soja e girassol^[20], servindo como ingredientes importantes em diversos alimentos e que podem ser transformados em margarinas – gorduras vegetais – através de processos químicos.

Os óleos vegetais são constituídos fundamentalmente por acilgliceróis (triacilgliceróis, diacilgliceróis e monoacilgliceróis) e ácidos gordos livres (saturados, monoinsaturados e polinsaturados), os quais representam os componentes maioritários de um óleo (97 – 99%). Os componentes em menor quantidade (1 – 3%) presentes são fosfolípidos, ceras, hidrocarbonetos, esteróis, álcoois superiores, pigmentos, vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), entre outros. Todavia, a composição dos óleos vegetais difere de diferentes fatores, como o tipo de semente, as condições climáticas e de cultivo a que foi sujeita durante o processo produtivo, o tipo de solo e as condições de armazenamento e transporte^[21].

2.4.Processamento Industrial dos Óleos Vegetais

Para a obtenção do óleo vegetal, a matéria-prima (sementes) deve passar por uma série de etapas e tratamentos até chegar ao produto final. Este processo apresenta certas diferenças conforme o tipo de óleo que se pretende obter. No esquema apresentado pela figura 2.4 é possível visualizar as diferentes etapas principais da extração dos óleos em geral.

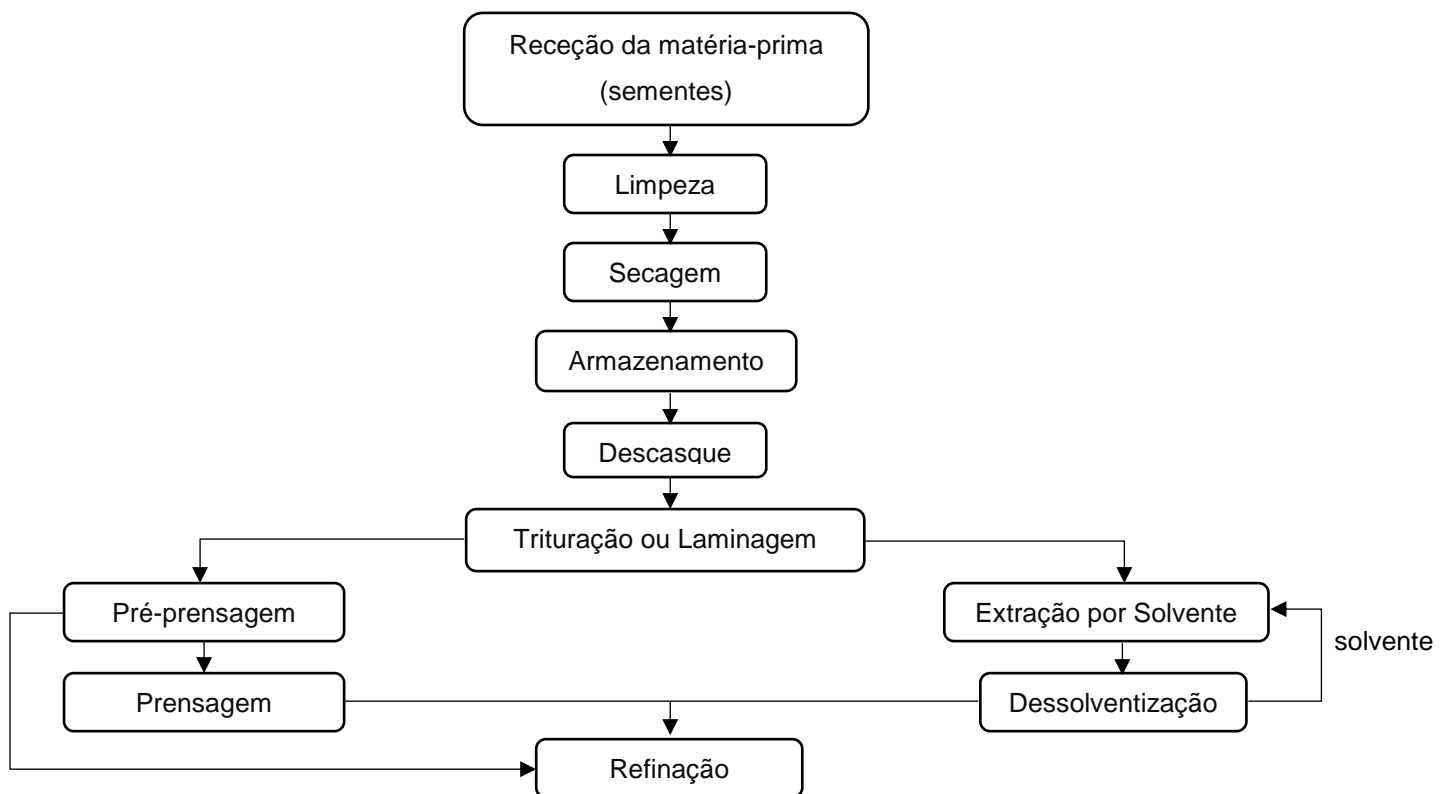


Figura 2.4 - Esquema representativo das etapas de tratamento e extração do óleo^[22]

É possível dividir o processo em duas partes: a primeira parte, que consiste na extração do óleo e a segunda parte, na sua refinação.

Na primeira parte, uma vez colhidas as sementes, estas devem ser limpas, para remoção de impurezas, como areias que podem danificar os equipamentos.

Seguidamente, as sementes são secas, de modo a reduzir a sua humidade e poderem ser armazenadas. Este passo, que recorre a gases de combustão, é o que mais contribui para a contaminação do óleo com PAH's uma vez que as sementes contactam diretamente com estes gases.

As sementes devem ser posteriormente descascadas antes dos passos de prensagem e extração do óleo. Este passo é necessário, pois a casca apresenta um elevado conteúdo em cera, que seria transferida ao óleo durante a extração, caso a casca não fosse removida. As indústrias de extração de óleo produzem um produto final sólido para além do óleo extraído. Este produto é normalmente

utilizado como componente importante para a constituição de alimento para animais, aproveitando-se quase a totalidade da semente.

As sementes seguem para o passo de trituração de modo a reduzir o tamanho de partícula para facilitar os tratamentos de prensagem e extração por solvente.

A parte final desta primeira parte do processo é constituída pelos processos de prensagem ou de extração com solvente para a extração do óleo. Sementes que contêm mais de 20 a 25% de óleo são normalmente comprimidas mecanicamente a fim de se extrair a maior parte do óleo disponível na matéria-prima. Esta operação é feita utilizando compressão total, de modo a obter-se uma recuperação máxima de óleo deixando apenas 5 a 10% de resíduo^[23]. No passo de extração com solvente, normalmente utiliza-se hexano, que deve ser posteriormente removido.

A segunda parte do processo, o refino do óleo, engloba diversos passos, como se observa esquematizado na figura 2.5, até se obter um óleo de qualidade.

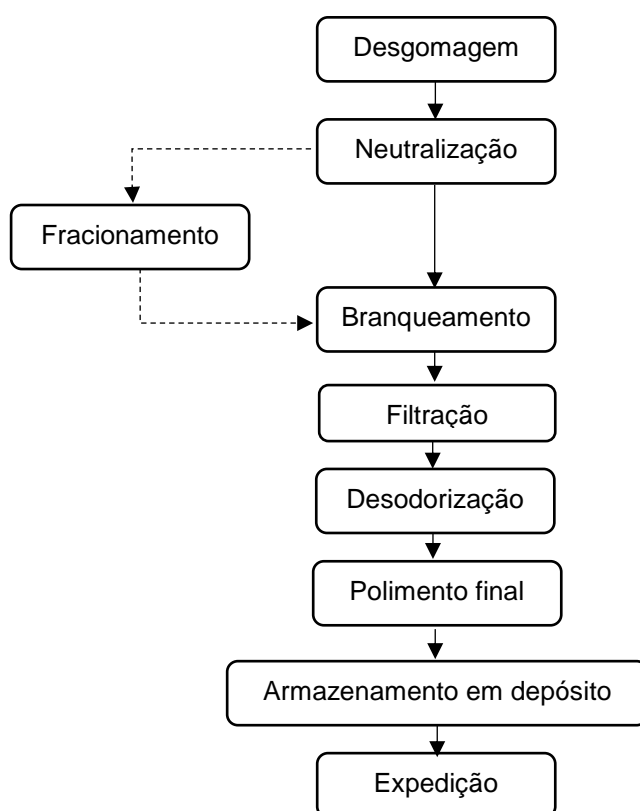


Figura 2.5 - Esquema representativo das etapas de refino do óleo^[21]

O óleo bruto segue para a primeira etapa de refino, a etapa de desgomagem, que tem como objetivo remover o conteúdo em fosfatídeos, (estes podem ser hidratáveis ou não hidratáveis) ou teor em fósforo, existente nos fosfatídeos, dos óleos crus. Este é considerado como o primeiro passo do processo de refinação, porém, nem sempre é um processo à parte, pois os fosfatídeos podem ser removidos noutras etapas do processo. A combinação de fatores como a composição do óleo, qualidade do produto final, perdas e custos de processo, custo de investimento e utilização e valor

dos subprodutos gerados é que vai definir a necessidade ou não da etapa dedicada à desgomagem do óleo^[24].

Os fosfatídeos hidratáveis podem ser facilmente removidos pela adição de água. As gomas hidratáveis são insolúveis no óleo e podem ser separadas por centrifuga.

Os fosfatídeos não hidratáveis são sais de ferro, sódio e magnésio do ácido fosfatídico e não são afetados pela água, permanecendo solúveis no óleo. Apenas podem ser condicionados a uma fase hidratável e portanto insolúvel no óleo, por tratamento com um ácido concentrado. O conteúdo de gomas não hidratáveis é muito diferente nos diversos óleos e também depende da qualidade das sementes das quais o óleo foi extraído^[25]. Geralmente, uma elevada quantidade de fosfatídeos não hidratáveis indica uma má qualidade do óleo^[24].

O passo de neutralização tem como objetivo eliminar os ácidos gordos livres presentes no óleo, os quais, para determinados fins, são inconvenientes^[26]. Para tal, utiliza-se uma solução de soda cáustica, transformando os ácidos livre em sabões que serão removidos do óleo através de processos físicos, através de separadores centrífugos e de forma contínua^[27].

Tanto os fosfatídeos como os ácidos gordos livres são compostos que aceleram o envelhecimento do óleo e devem ser removidos^[28].

O processo de fracionamento, também denominado *winterização*, tem como objetivo remover as ceras e estearinas (gorduras) contidas no óleo, as quais podem solidificar quando sujeitas a baixas temperaturas, atribuindo turbidez ao óleo^[29].

O passo de branqueamento é dos passos mais importantes no processo de refino do óleo para a remoção dos PAH's. Tal como o nome indica, este é encarado como um processo de redução da cor do óleo, tendo como objetivo a remoção de pigmentos indesejáveis, como a clorofila, carotenos, traços de metais e produtos oxidados (peróxidos). Nesta etapa do processo é utilizado carvão ativado, que é considerado muito eficiente e eficaz na remoção dos PAH's. Assim, são eliminados PAH's pesados e leves, por adsorção em carvão ativado^[30], sendo este removido através do passo seguinte de filtração.

A desodorização tem como finalidade a remoção de substâncias que conferem um odor desagradável ao óleo, melhorando também o sabor, cor e estabilidade do produto^[26]. Este passo, para além de remover muitos compostos indesejáveis, é também dos passos mais importantes para a remoção dos PAH's leves^[31].

Por fim, o óleo passa por um polimento final que consiste numa etapa de segurança, onde, por filtração, se removem todos os sólidos vestigiários e ceras ainda existentes no óleo^[29]. Os óleos, já próprios para consumo, são agora armazenados para posterior comercialização.

Conclui-se que os passos de refino que levam à remoção dos PAH's são o branqueamento e o de desodorização, ao passo que a etapa que mais contribui para a contaminação dos PAH's é o passo de secagem na etapa inicial de pré-tratamento, esquematizado resumidamente na figura 2.6.

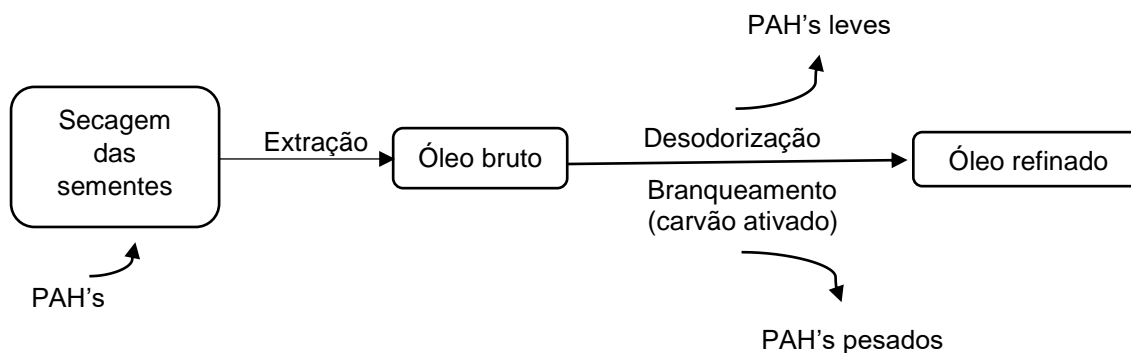


Figura 2.6 - Esquema resumo das etapas de contaminação e remoção dos contaminantes PAH's ^[adaptado de 2]

2.5.Extração e Quantificação dos PAH's

Um dos maiores problemas na extração de PAH's dos óleos vegetais deve-se ao facto destes serem lipossolúveis, dissolvendo-se em compostos cuja composição seja constituída maioritariamente por lípidos, como é o caso dos óleos vegetais, dificultando a sua eliminação.

A maior parte dos PAH's é removida nos passos de desodorização e branqueamento do processo de refinação do óleo, como explicado anteriormente. Estes processos devem ser de tal maneira eficientes, que o produto final cumpra estreitas especificações para a quantidade destes contaminantes nos produtos dedicados a consumo humano. Para saber se os limites de concentração estipulados estão a ser cumpridos, são utilizadas técnicas para a extração e quantificação destes contaminantes. Métodos como a extração em fase sólida e cromatografia líquida (UPLC) são utilizados para a extração e quantificação destes contaminantes nos óleos e gorduras.

Existem diferentes métodos para a extração e determinação destes contaminantes, desde processos mais complicados e morosos, até processos mais simples em que se poupa mais tempo e se obtém maior rendimento de extração. Processos mais complexos e demorados utilizam técnicas como extração líquido-líquido seguida de extração em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), muitas das vezes utilizando múltiplas extrações, tornando-se desadequados para análises de rotina^[14], ao passo que processos mais simples, menos demorados e com maior rendimento de extração, utilizam técnicas como a extração em fase sólida seguida de cromatografia líquida HPLC ou UPLC.

2.5.1. Princípios da Técnica de Extração em Fase Sólida (SPE)

A preparação da amostra é um passo que não pode ser eliminado, mas pode ser otimizado. Devem ser aplicadas técnicas que permitam obter elevado rendimento, sendo para tal, necessário minimizar os passos intermédios de extração.

A técnica de extração em fase sólida é uma técnica simples e rápida de utilizar, que tem como objetivo separar os compostos de interesse da matriz e das impurezas, reduzindo muitos os problemas associados à técnica de extração líquido-líquido. É uma técnica que permite a redução tanto da quantidade de solvente utilizado, como do material utilizado e aumentar o rendimento da extração, através da eliminação de passos anteriores de extração, reduzindo assim a perda do composto de interesse.

Normalmente esta técnica realiza-se em colunas que contêm partículas sólidas como enchimento (fase estacionária) e permite a separação dos componentes da mistura através da interação com a fase estacionária.

Existem vários tipos de extração em fase sólida conforme o tipo de interação entre a fase móvel e a fase estacionária: extração em fase reversa, fase normal, troca iónica e adsorção^[32]. No caso deste trabalho vai ser utilizada extração em fase reversa em que a fase estacionária é um polímero, sendo esta técnica explicada no capítulo seguinte.

Nesta técnica, o componente de interesse está dissolvido na matriz, sendo necessário remover a matriz, de modo a obter os analitos de interesse. Para tal, recorre-se às etapas esquematizadas na figura 2.7, que vão desde o condicionamento do cartucho (preparação do cartucho para receber a amostra) até ao passo final de eluição.

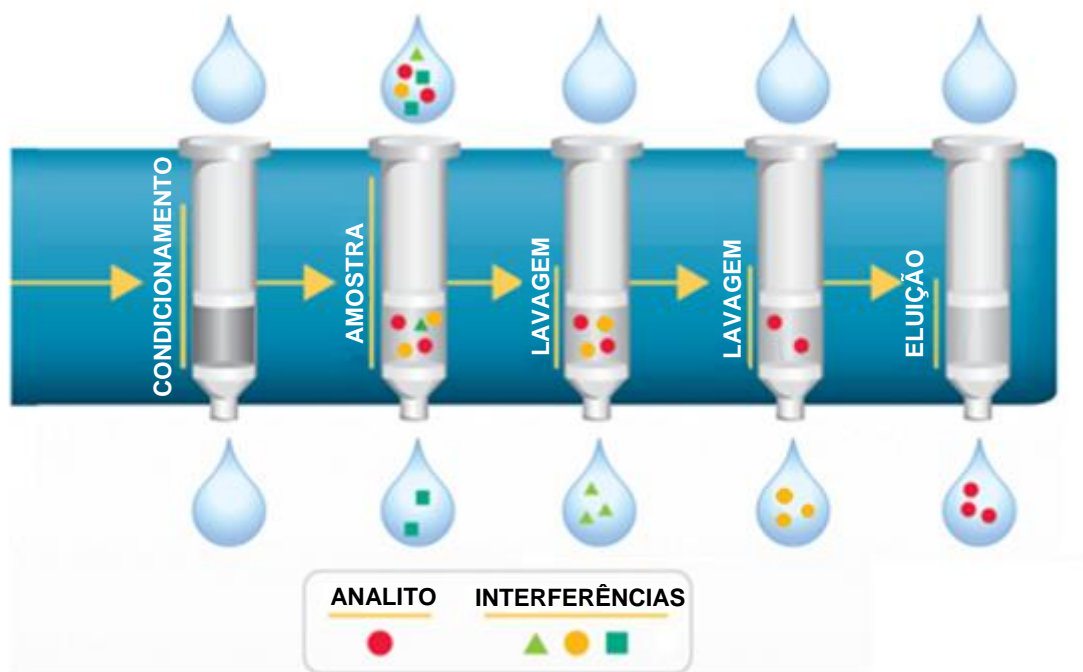


Figura 2.7 - Exemplo das etapas de extração em fase sólida dos componentes de interesse numa mistura ^[adaptado de 33]

Em primeiro lugar é realizado o passo de condicionamento do cartucho, que, tal como referido anteriormente, tem como objetivo preparar o cartucho para receber a amostra. Seguidamente, adiciona-se a amostra, previamente dissolvida num solvente que apresente afinidade com a matriz que se pretende remover. Depois o mesmo solvente é utilizado para o passo de lavagem do cartucho de modo a remover os interferentes que se pretendem eliminar, enquanto que os analitos de interesse ficam retidos na fase estacionária do cartucho, não sendo ainda eluídos nesta fase. Só no último passo se faz a eluição do cartucho com um solvente mais forte de modo a remover os analitos de interesse que estão retidos na fase estacionária. Neste trabalho, a fase estacionária utilizada é um polímero com impressão molecular (MIP) que foi previamente processado para ter cavidades específicas para interagir com elevada afinidade com o analito de interesse, ou analitos relacionados estruturalmente^[34].

Esta técnica é importante pois permite obter separações mais rápidas e com maior rendimento, utilizando-se por vezes apenas uma extração, poupando-se tempo, material de laboratório, solvente, entre outros.

2.5.1.1. Polímeros Molecularmente Impressos (MIP's)

Polímeros molecularmente impressos (MIP's) são uma classe de elementos de elevado reconhecimento molecular constituídos por polímeros reticulados construídos para ligar um composto-alvo ou uma classe de compostos-alvo estruturalmente relacionados com elevada seletividade. Durante a síntese dos MIP's, uma molécula *template*, desenhada para imitar o analito,

guia a formação de cavidades específicas ou partes da molécula que são química e estericamente complementares ao analito-alvo. Isto leva a interações mais fortes entre a fase sólida e o analito contribuindo para a elevada seletividade destes polímeros. O passo inicial da preparação dos MIP's consiste na mistura de uma molécula *template* com uma estrutura análoga ao analito de interesse com um ou mais monómeros funcionais. Como ilustrado na figura 2.8, os monómeros formam complexos espontâneos à volta do *template*. Para que a polimerização possa continuar, é adicionado um solvente que ajuda à formação de poros. É feito um extenso procedimento de lavagem para remover o *template* do polímero, deixando as marcas, ou sítios de ligação que são química e estericamente complementares ao *template*^[34].

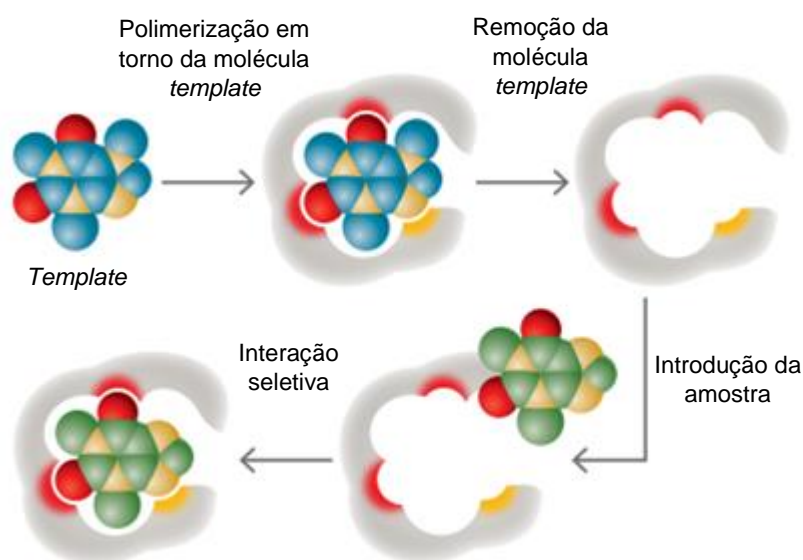


Figura 2.8 - Formação de MIP's^[adaptado de 34]

Deste modo, através da utilização deste método, a extração é realizada com um maior rendimento pois esta técnica é altamente seletiva por ser específica para o composto de interesse.

2.5.2. Princípios da Técnica de Cromatografia Líquida (UPLC)

Para a separação e determinação de compostos em matrizes alimentares, são diversas as técnicas utilizadas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa (GC), cromatografia em camada fina (TLC), eletroforese capilar (CE) e a cromatografia com fluidos supercríticos (SFC). Contudo, os métodos mais utilizados para a determinação de PAH's óleos vegetais são HPLC e GC, sendo que atualmente se tem vindo a utilizar técnicas como UPLC por trazer vantagens em relação aos anteriores.

A cromatografia líquida é uma técnica utilizada para separar componentes de uma mistura. Os diferentes componentes são separados de acordo com a sua afinidade com a fase móvel. Ou seja, se um componente na mistura tiver mais afinidade com a fase móvel do que outro, é eluído primeiro o componente com maior afinidade com a fase móvel, seguida do componente com menor afinidade com esta. No cromatograma, depois dos componentes detetados, obtemos os seus respetivos picos, com o correspondente tempo de retenção, que é menor para compostos com maior afinidade com a

fase móvel e vice-versa. Conforme a sua quantidade na amostra, os picos dos diferentes componentes vão apresentar áreas diferentes, sendo que, quanto maior a quantidade de determinado componente, maior será a área do seu pico.

A técnica de HPLC tem vindo a ser grandemente utilizada pois permite obter componentes vestigiais das amostras, com elevado rendimento, precisão e resolução. Foram feitos significativos avanços quando surgiu a técnica de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC). Esta surgiu como uma melhoria da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), pois permite trabalhar com pressões de operação mais elevadas (até 15000 psi), obter resultados com melhor resolução, sensibilidade e em menor tempo.

Uma diferença importante entre as duas técnicas é o tipo de coluna que utilizam. Técnicas de HPLC utilizam colunas de maior comprimento e tamanho de partículas, enquanto técnicas de UPLC utilizam colunas mais pequenas e com tamanho de partículas mais pequeno, o que leva à otimização do tempo de cada análise cromatográfica. Na figura 2.9 é possível visualizar a comparação entre as duas técnicas, tornando-se mais evidente a vantagem de utilização da técnica de UPLC.

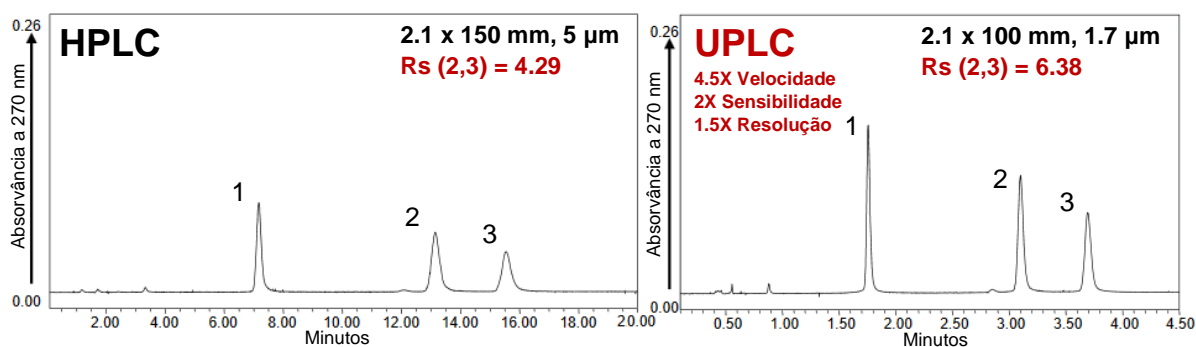


Figura 2.9 - Comparação das técnicas HPLC e UPLC [adaptado de 35]

A coluna de cromatografia é constituída por duas componentes, a fase estacionária, que é constituída por partículas sólidas e a fase móvel que é um solvente cuja polaridade é selecionada de acordo com a fase estacionária. Para a separação dos PAH's são utilizadas normalmente colunas de octadecilo (C18), sendo o tipo de cromatografia, em fase reversa. Neste caso a fase estacionária é constituída por material apolar, enquanto a fase móvel é um solvente polar.

No final, os diferentes constituintes da mistura são detetados utilizando diversas técnicas de deteção, sendo as mais utilizadas a deteção por UV-VIS e por fluorescência. Como a maioria dos PAH's emite fluorescência, é vantajoso a utilização deste tipo de deteção, tornando-se mais seletiva, pois cada PAH possui um comprimento de onda de excitação e emissão específicos. Selecionando estes comprimentos de onda, estes compostos podem ser detetados sem interferência de outros interferentes.

2.6. Espectroscopia de Fluorescência

Espectroscopia de fluorescência é um tipo de espectroscopia eletromagnética que analisa a fluorescência de uma amostra. Envolve o uso de um feixe de luz para excitar os elétrons das moléculas de certos compostos, levando-os a emitir luz. Dispositivos que medem a fluorescência são denominados fluorímetros^[36].

Um instrumento de fluorescência é composto essencialmente por três componentes: o detetor, uma fonte de luz e um suporte para a amostra^[37], como se visualiza na figura 2.11.

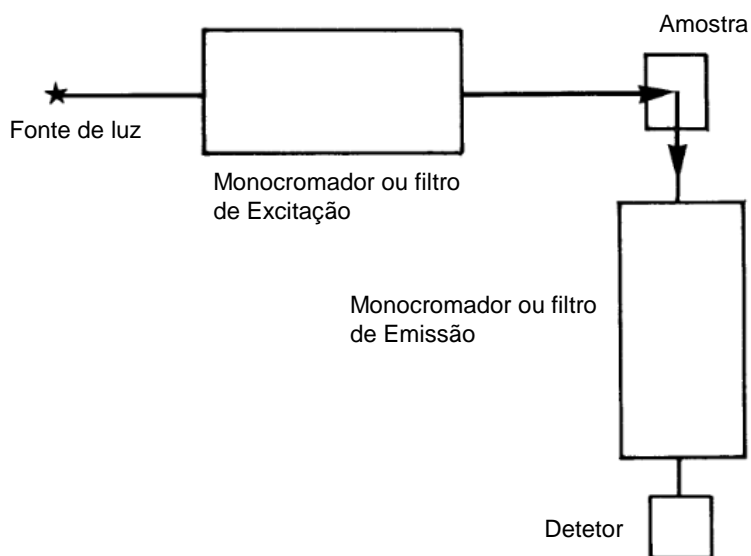


Figura 2.10 - Componentes essenciais de um espectrômetro de fluorescência^[adaptado de 38]

Os detetores de fluorescência podem ser muito seletivos, pois para uma dada molécula, pode especificar-se os comprimentos de onda de excitação e emissão. Para tal, é usado um dispositivo ótico (monocromador) que permite transmitir uma faixa estreita de comprimentos de onda de luz. Esta especificação permite não só, um determinado composto ser detetado na presença de interferências que tenham forte absorvância no UV e não tenham fluorescência a comprimentos de onda específicos^[39], como também permite que a zona de sobreposição dos espectros seja eliminada, caso contrário a luz de excitação da molécula, que é mais intensa, sobrepõe-se à luz de fluorescência emitida, que é mais fraca^[40].

Quando uma luz incide numa molécula, os seus elétrons passam do estado fundamental para um dos níveis vibracionais mais elevados de um estado excitado. Através de colisões com outras moléculas, a molécula perde o excesso de energia vibracional e passa para o nível vibracional mais baixo, ainda do estado excitado. Quando os elétrons voltam do primeiro estado excitado, ao estado fundamental ($S_1 \rightarrow S_0$), emitem fluorescência. Este processo pode ser visualizado através de um diagrama de Jablonski como o apresentado na figura 2.10. Os detetores de fluorescência baseiam-se nesta propriedade molecular para conseguirem detetar as moléculas.

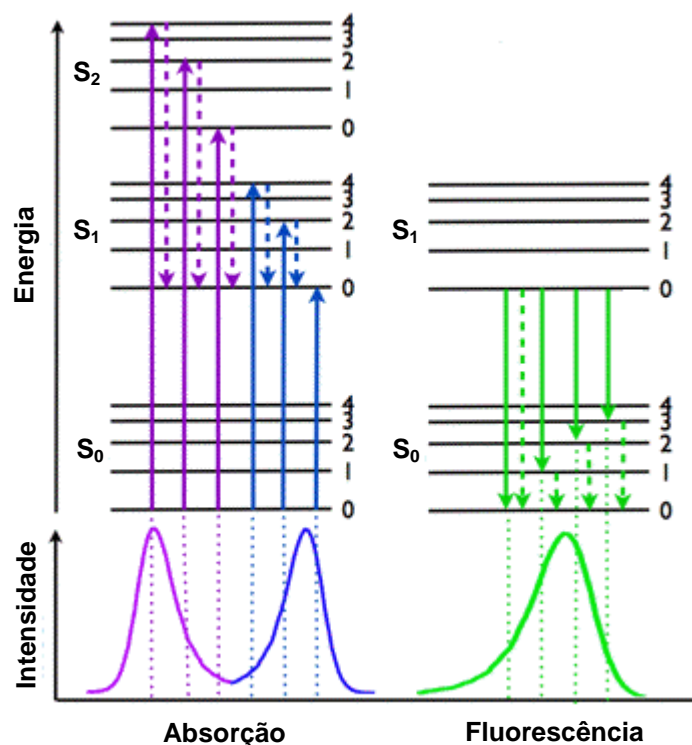


Figura 2.11 - Representação do diagrama de Jablonski com os espectros de absorção/excitação e emissão (fluorescência) ^[adaptado de 36]

O nível vibracional mais baixo para estados excitados superiores ao 2º, corresponde ao último nível vibracional do estado excitado anterior (mesma energia). Quando a molécula absorve energia e passa para um dos níveis vibracionais mais elevados de um estado excitado superior ao 2º, perde energia vibracional por colisões entre moléculas e passa para o nível vibracional de menor energia desse estado excitado. Este tem a mesma energia que o nível de maior energia vibracional do estado excitado anterior (mais baixo), de maneira que a molécula passa para este nível através de conversões internas. A partir daí, a molécula volta a perder energia até atingir o menor nível vibracional do 1º estado excitado.

As moléculas que emitem fluorescência, apresentam um espectro de absorção e emissão característicos. Estes são representados como intensidade da luz versus comprimento de onda, apresentando-se simétricos, com uma zona de sobreposição nos comprimentos de onda maiores do final do espectro de excitação e nos comprimentos de onda mais baixos do espectro de emissão.

Para uma dada molécula, é absorvida mais energia do que a que é emitida, de modo que os gráficos de absorção e emissão não se sobrepõem totalmente. Assim, o gráfico do espectro de absorção de uma molécula, vai estar representado mais à esquerda (comprimentos de onda menores – maior energia), enquanto o espectro de emissão da mesma, vai estar representado mais à direita (comprimentos de onda maiores – menor energia), como representado na figura 2.12.

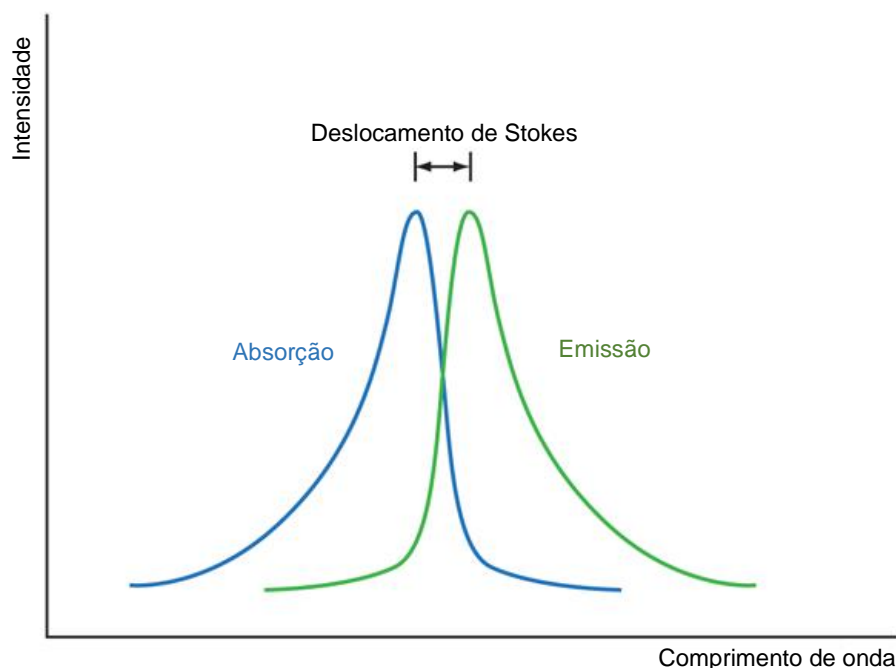


Figura 2.12 - Representação do deslocamento de Stokes^[adaptado de 39]

Este fenómeno de afastamento entre os dois espectros é designado deslocamento de Stokes (Stokes Shift) e é representado como a diferença entre os máximos dos dois espectros.

2.7.Caraterização da Empresa

O Grupo Sovena é o líder mundial na produção e comercialização de azeite, detentor do maior olival em Portugal e de vários investimentos agrícolas em Espanha e Marrocos, sendo também detentor de grandes marcas, como a Oliveira da Serra, Fula, Vêgê, Frigi, Clarim, entre outras^[41].

2.7.1. História

A formação da Sovena começou nos finais do século XIX, quando Alfredo da Silva fez nascer o primeiro Grupo industrial, comercial e financeiro de Portugal: a Companhia União Fabril, CUF, que resultou da junção de duas pequenas empresas químicas, a União Fabril e a Companhia Aliança Fabril^[42].

No início do séc. XX, a CUF era já o maior Grupo português, com um complexo industrial no Barreiro incomparável pelo seu avanço tecnológico, desenvolvimento empresarial e modernização institucional, responsável por 5% do PIB nacional, com mais de 100 empresas, 1000 produtos em produção e 110.000 colaboradores, abrangendo diferentes áreas de negócio: construção naval, adubos, têxteis, ácidos e óleos alimentares, entre outras^[42].

Apesar da sua sobrevivência a duas grandes guerras mundiais, a instabilidade social e política causada pelo fim da ditadura em Portugal, em abril de 1974, levou ao fim da CUF. Mais tarde, com o

regresso da estabilidade social e política no país, Jorge de Mello e José Manuel de Mello, filhos do industrial Alfredo da Silva, iniciam a reconstrução do Grupo^[42].

Na década de 80, Jorge de Mello adquire a Sociedade Alco, Algodoeira Comercial e Industrial, dedicada à extração, refinação e embalagem de óleos alimentares, e posteriormente, a Fábrica Torrejana de Azeites, em Torres Novas^[42].

Na década de 90, o grupo adquire a Lusol, cuja atividade consistia na extração e refinação de óleos e produção de sabões; a Tagol, responsável pela extração e refinação de oleaginosas através de contrato com a multinacional Bunge; e a Sovena, nascida em 1956 de uma parceria entre a CUF, a Macedo e Coelho e a Sociedade Nacional de Sabões, para comercialização de óleos vegetais e sabões. Com estas novas aquisições, a posição do Grupo no mercado dos óleos e azeites é reforçada^[41].

2.7.2. Internacionalização

Já no séc.XXI, a empresa começa a sua internacionalização, expandindo para Espanha, em 2001, seguindo-se o Brasil em 2004, os Estados Unidos em 2005 e depois Marrocos e Tunísia em 2006 e 2007 respetivamente. A empresa marca, atualmente, presença em sete países, três continentes, com oito fábricas espalhadas pelo mundo e três lagares de azeite^[43].

2.7.3. Organização

Este grupo tem um total de quatro áreas de negócio inter-relacionadas e que cobrem todo o espetro da cadeia de valor dos azeites e azeitonas, mas também dos óleos e dos sabões: Biodiesel, Agriculture, Oilseeds e Consumer Goods^[41, 44].

Sovena Consumer Goods – Produtos, desde azeite, óleos vegetais, azeitonas, vinagres e sabões;

Sovena Oilseeds – A génese do grupo são as sementes de óleos vegetais;

Sovena Agriculture – Esta área de negócio consiste na exploração dos campos de plantação de oliveiras;

Sovena Biodiesel – Área de negócio que produz biocombustíveis a partir de óleo vegetal.

2.8. Validação da Metodologia Analítica

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações suscetíveis de acumular erros (sistemáticos e/ou aleatórios), podendo assim, em algumas situações levar a alterações significativas do resultado final^[45].

Os laboratórios que praticam métodos internos de ensaio devem poder demonstrar que estes, nas condições em que são praticados, têm as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida. É, deste modo, fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrarem, através da Validação, que os métodos internos de ensaio que executam, conduzam a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida^[45].

No caso do presente trabalho, será instruído um processo de validação, pois trata-se de um método existente, implementado na Sovena em Espanha, pretendendo-se a sua validação no laboratório da Sovena do Barreiro, assim como a sua implementação, pois, como se verá mais à frente, o método teve de ser alterado em certos parâmetros.

No presente trabalho, os parâmetros necessários à validação do método foram avaliados segundo o guia Relacre 13. Assim, para a validação de métodos internos de ensaio, devem ser estudados os seguintes parâmetros, tidos como os requisitos mínimos^[45]:

- Gama de trabalho/Linearidade
- Limiares Analíticos (Deteção e Quantificação)
- Sensibilidade
- Precisão
- Exatidão

Para o presente método é importante a determinação de todos os parâmetros referidos, para que se possa demonstrar que o método interno de ensaio, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida^[45].

Serão utilizados testes estatísticos para avaliar os parâmetros referidos, pois estes são essenciais para resumir dados e fazer julgamentos objetivos nas diferenças entre conjuntos de dados^[46].

2.8.1. Curva de Calibração

A calibração indica um processo pelo qual a resposta de um sistema de medida se relaciona com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida. Para a construção da curva de calibração, o analista deve preparar uma série de soluções padrão em que a concentração do

parâmetro a dosear é conhecida. Estas soluções padrão são medidas num equipamento analítico, nas mesmas condições das amostras a analisar^[45].

Deve ser construído um gráfico de calibração que represente o sinal de resposta do equipamento em função da concentração do analito, de modo a determinar, por interpolação, a concentração do analito nas amostras. Utilizando o método dos mínimos quadrados, efetua-se uma regressão linear em que a variável dependente (y) representa sempre a resposta instrumental do equipamento, que neste caso, por se tratar de um método cromatográfico, vai ser a área do pico, enquanto a variável dependente (x) representa sempre a concentração dos padrões^[47].

São recomendados dez pontos de calibração, não devendo ser em número inferior a cinco, distribuindo-se de igual modo na gama de concentrações. O modelo de regressão linear é válido quando o coeficiente de correlação linear apresenta um valor superior a 0,995^[47,45].

2.8.1.1. Gama de Trabalho

A gama de trabalho é definida como o intervalo entre a concentração mais alta e a mais baixa (incluindo estas), para o qual é demonstrado que o procedimento seja determinado com a precisão, exatidão e linearidade exigidas^[48].

Quando se utiliza uma metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias.

Para tal, são analisados o primeiro e último padrões em dez réplicas independentes e calculadas as respetivas variâncias S_1^2 e S_{10}^2 , do seguinte modo^[45]:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}$$

Sendo:

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i}$$

Para $i=1$ e $i=10$

Sendo:

i – o número do padrão (neste caso i vai de 1 a 10)

j – o número de repetições efetuadas para cada padrão

y_i – valores de y (sinal instrumental)

\bar{y} – média aritmética dos valores do sinal instrumental

n – número de repetições realizadas

As variâncias são testadas para examinar a existência de diferenças significativas entre elas, nos limites da gama de trabalho, efetuando o cálculo do valor teste PG :

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}, \text{ quando } S_{10}^2 > S_1^2.$$

Caso contrário, PG será calculado inversamente:

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}.$$

De modo a verificar se as diferenças de variâncias são, ou não, significativas, o valor de PG é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Fisher, a um nível de confiança de 95% ou 99% e para $n-1$ graus de liberdade ($n-1=9$)^[45]:

- Se $PG \leq F$, a diferença das variâncias não é significativa e a gama de trabalho está bem ajustada.
- Se $PG > F$, a diferença das variâncias é significativa e a gama de trabalho deve ser ajustada até que a diferença entre as variâncias relativas ao 1º e último padrões permita obter $PG \leq F$.

2.8.1.2. Linearidade

A linearidade é definida como a capacidade de, dentro de uma gama de trabalho, obter resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração (quantidade) de analito na amostra^[48].

Muitas das vezes é utilizado o coeficiente de correlação (r) de uma reta de calibração para avaliar se a reta é apropriada como modelo matemático. Contudo, este coeficiente não indica linearidade, apenas indica se existe um bom ajuste dos pontos experimentais, a uma reta, ou seja, apenas indica se existe, ou não, uma boa correlação^[49]. Assim, para este estudo, devem ser realizados testes para comprovar a linearidade da reta.

De modo a garantir uma avaliação fiável, são realizados testes de linearidade complementares ao coeficiente de correlação, como o teste de RIKILT, teste das áreas normalizadas, análise de resíduos e o teste de Mandel.

Teste de RIKILT

O teste de RIKILT permite a análise da linearidade em cada ponto da reta de calibração. Para tal é determinada a razão entre cada sinal instrumental (Y_i) e a concentração respetiva (X_i), assim como o valor médio desta razão, sendo este considerado 100%, em caso de linearidade perfeita.

$$\frac{\frac{Y_i}{\bar{X}_i}}{\text{Valor médio } (\frac{Y_i}{\bar{X}_i})} * 100$$

Para admitir linearidade numa determinada gama de trabalho, definiu-se que os valores não devem apresentar um valor de desvio superior a 10%, ou seja, os valores devem estar entre 90 e 110%. Caso existam valores que se encontrem fora deste intervalo, esses valores devem ser rejeitados e o teste de RIKILT novamente aplicado à gama reduzida, até que se verifiquem os requisitos estabelecidos^[50].

Teste das Áreas Normalizadas

A distribuição dos valores normalizados tem como objetivo avaliar a dispersão dos valores obtidos na calibração em relação aos valores ótimos, para que não seja superior a um intervalo previamente estabelecido. A partir da equação da reta obtida na regressão linear, estimam-se as áreas dos picos, para a gama de concentrações usada. Para cada um dos pontos, calculou-se a razão entre o valor de área obtida experimentalmente e o valor da área estimada através da regressão linear. A concentração para a qual esta razão se aproxima mais de 1 é denominada C_{100} , ou seja é a concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação. Aplica-se, então, a seguinte fórmula a cada uma das concentrações^[51]:

$$\text{Área Normalizada} = \frac{\left(\frac{A_i}{C_i}\right)}{\left(\frac{A_{100}}{C_{100}}\right)} * 100$$

Em que:

A_i – área do pico correspondente a uma determinada concentração

C_i – concentração correspondente à área A_i

A_{100} – área do pico correspondente ao ponto experimental com melhor correlação

C_{100} – concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação

Para admitir a existência de linearidade, numa determinada gama de concentração, foi definido que os valores normalizados não podiam ter um desvio superior a 15%, isto é, deverão estar compreendidos entre 85 e 115%. Sempre que existirem valores normalizados que apresentem um desvio superior a 15% devem ser excluídos, reduzindo a gama de concentrações e aplicando-se novamente o teste até que estes requisitos sejam satisfeitos^[51].

Análise de Resíduos

A ideia básica da análise dos resíduos é que, se o modelo for apropriado, os resíduos devem refletir as propriedades impostas pelo termo de erro do modelo^[52]. Para que a análise de resíduos seja considerada válida, devem-se verificar as seguintes suposições: os resíduos seguem uma distribuição Normal, são independentes e a sua variância é homogénea. Os resíduos, que não são

mais do que estimativas do erro experimental, obtêm-se pela diferença entre os valores observados e a média das observações do nível correspondente. Assim, os resíduos são dados pela expressão^[53]:

$$e_i = y_i - \bar{y}_i$$

Em que:

e_i – resíduos

y_i – valor observado

\bar{y}_i – média das observações do nível correspondente

i – posição ou nível da observação

A análise de resíduos deve incluir os seguintes aspetos:

a. Normalidade

Um dos métodos práticos para verificar se a distribuição dos dados, neste caso dos resíduos, é Normal, consiste em representar graficamente os resíduos, por ordem crescente de grandeza e as frequências acumuladas observadas. Estas são calculadas através da expressão^[53]:

$$P_i = \frac{i - 0,5}{n}$$

Onde:

P_i – frequência acumulada observada correspondente à observação i

i – posição ou nível da observação

n – número de observações

Depois de representados os valores graficamente, deve ser ajustada uma linha, e esta deve ser aproximadamente retilínea de modo a concluir-se que a distribuição de valores não se afasta da Normalidade^[53].

De modo à visualização de *outliers*, é construído um gráfico com os valores dos resíduos normalizados e os resíduos por ordem crescente, utilizando a função distribuição Normal Reduzida onde se retira os valores de Z (valores normalizados), através dos valores das frequências acumuladas observadas. Caso haja algum *outlier*, este encontra-se fora do limite $(-2,2)$ ^[53].

É de salientar que este método é prático e subjetivo, pelo que é aconselhável utilizar, sempre que possível, testes estatísticos objetivos, como o teste do Qui-Quadrado e o teste de Kolmogorov-Smirnov, que são amplamente utilizados na área da Qualidade quando se pretende verificar a Normalidade dos dados^[53].

- Teste de Kolmogorov-Smirnov

Este teste consiste, para uma determinada variável aleatória X , na verificação do ajustamento da Função de Distribuição amostral (empírica) $S(x)$, definida por $S(x) = P(X \leq x)$, à Função de Distribuição da população $F_0(x)$ ^[53].

Começa-se por especificar a Hipótese Nula e a Hipótese Alternativa:

$$H_0 = F(x) = F_0(x), \text{ para todos os valores de } X$$

$$H_1 = F(x) \neq F_0(x), \text{ para algum valor de } X$$

Seguidamente, colocam-se os valores da amostra, neste caso os resíduos, por ordem crescente do seu valor, designando por $x_{(i)}$ a observação de ordem i , onde $x_{(i+1)} > x_{(i)}$ e calculam-se os valores de $S(x)$, $F_0(x)$ e $|S(x) - F_0(x)|$ para $i = 1, 2, \dots, N$. Para facilitar, utiliza-se uma tabela como a tabela 2.4^[53]:

Tabela 2.4 - Tabela para aplicação do teste de Kolmogorov-Smirnov

i	X	$S(x)$	Z	$F_0(x)$	$ S(x) - F_0(x) $
1	$x_{(1)}$	$P(X \leq x_{(1)})$	$z_1 = \frac{x_{(1)} - \mu}{\sigma}$	$P(Z \leq z_1)$	$ 0 - F_0(x_{(1)}) $
					$ S(x_{(1)}) - F_0(x_{(1)}) $
2	$x_{(2)}$	$P(X \leq x_{(2)})$	$z_2 = \frac{x_{(2)} - \mu}{\sigma}$	$P(Z \leq z_2)$	$ S(x_{(1)}) - F_0(x_{(2)}) $
					$ S(x_{(2)}) - F_0(x_{(2)}) $
3	$x_{(3)}$	$P(X \leq x_{(3)})$	$z_3 = \frac{x_{(3)} - \mu}{\sigma}$	$P(Z \leq z_3)$	$ S(x_{(2)}) - F_0(x_{(3)}) $
					$ S(x_{(3)}) - F_0(x_{(3)}) $
.
.
.

Deve ser determinada a estatística de teste (D) e comparar este valor, com o valor crítico $D_{\text{crítico}}$, que se retira da tabela A.1 em anexo, depois de definir o nível de significância α .

A estatística de teste é definida por:

$$D = \sup_x |S(x) - F_0(x)|$$

Finalmente, rejeita-se a Hipótese Nula, para um nível de significância α , se:

$$D > D_{\text{crítico}}$$

A rejeição de H_0 permite concluir que a distribuição não é Normal. Se, pelo contrário, $D < D_{\text{crítico}}$, não se rejeita H_0 e, consequentemente, admite-se que a distribuição é aproximadamente Normal^[53].

- Teste do Qui-Quadrado

Para o teste do χ^2 começa-se por dividir os valores em intervalos. Definem-se os intervalos k e conta-se o número de medidas observadas em cada intervalo^[52], como exemplificado na tabela 2.5.

Tabela 2.5 - Exemplo de $n=4$ intervalos a escolher para o cálculo das medidas observadas

Intervalo k	Limites do intervalo	O_k (nº de medidas observadas no intervalo k)
1	$e \leq \bar{e} - \sigma$	O_1
2	$\bar{e} - \sigma < e \leq \bar{e}$	O_2
3	$\bar{e} < e \leq \bar{e} + \sigma$	O_3
4	$e > \bar{e} + \sigma$	O_4

Em que \bar{e} representa o valor médio dos resíduos.

Em seguida, é calculado o número de medidas E_k que seria esperado obter em cada intervalo k . A área delimitada pela função de Gauss já é conhecida, de maneira que, tendo definido 4 intervalos, consideram-se quatro probabilidades ($Prob_1$, $Prob_2$, $Prob_3$, $Prob_4$) correspondentes às áreas definidas na figura 2.13^[52].

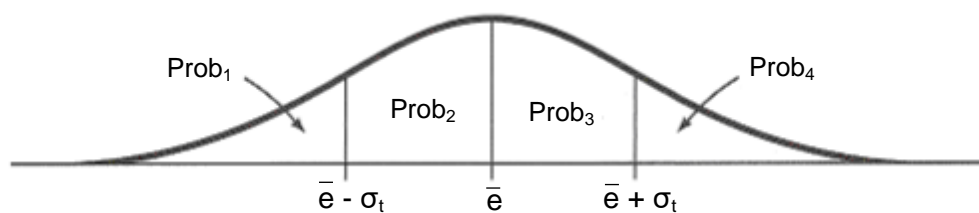


Figura 2.13 - Áreas delimitadas pela função Gaussiana e pelos limites dos n intervalos^[adaptado de 52]

As duas áreas $Prob_2$ e $Prob_3$ correspondem à conhecida quantidade 68%. Portanto, $Prob_2 = Prob_3 = 0,34$. As outras duas probabilidades correspondem à quantidade remanescente (32%) e, portanto, $Prob_1 = Prob_4 = 0,16$. Para o cálculo dos números esperados E_k , utiliza-se a fórmula^[52]:

$$E_k = N * Prob_k$$

Em que N é o nº total de medidas.

Para se avaliar se a distribuição de frequências experimental é bem ajustada por uma distribuição de probabilidades Gaussiana, analisam-se os desvios ($O_k - E_k$).

Para “calibração” desse ajuste, adota-se um número de mérito designado por Qui-Quadrado, dado pela expressão^[52]:

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^N \left(\frac{\text{valor observado} - \text{valor esperado}}{\text{desvio padrão}} \right)^2$$

Este número é extraído da comparação dos dados experimentais com os valores previstos pela distribuição esperada e é dado pelo somatório:

$$\chi^2 = \sum_{k=1}^n \frac{(O_k - E_k)^2}{E_k}$$

O χ^2 constitui um indicador razoável para verificar o acordo entre a distribuição observada e a esperada. Se $\chi^2 = 0$, o acordo é perfeito, embora essa situação seja altamente improvável. Em geral, espera-se que cada termo da soma seja da ordem de 1 e, portanto, como haverá n termos (n intervalos), $\chi^2 \leq n$. Esta corresponderá então à situação em que a hipótese é verificada experimentalmente. Pelo contrário, $\chi^2 \gg n$ significará que a hipótese estava incorreta e não se pode assumir distribuição Normal dos dados^[52].

b. Independência

Um simples gráfico dos resíduos em função da ordem aleatória pela qual as experiências foram efetuadas é o método mais fácil de avaliar a independência. Se a hipótese de independência for razoavelmente satisfeita, os resíduos deverão dispor-se no gráfico de forma aleatória, sem demonstrarem qualquer tendência especial^[53].

c. Homogeneidade da variância

O método mais simples de verificar se a variância é constante consiste na construção de um gráfico dos resíduos em função dos valores previstos ou estimados. Caso o pressuposto da variância ser constante não seja fortemente violado, o gráfico não apresentará qualquer estrutura essencial^[53]. Para maior objetividade, utiliza-se o teste de Cochran, que compara a maior variância com as demais.

• Teste de Cochran

Em primeiro lugar calcula-se a estatística de teste, C ^[54]:

$$C = \frac{s_{\max}^2}{\sum_{i=1}^k s_i^2} = \frac{\text{maior variância}}{\text{soma de todas as variâncias}}$$

Em que:

k – nº de níveis do fator

s_i^2 – variância amostral, calculada através da expressão^[54]:

$$s_i^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$$

n – nº de medidas em cada nível do fator

Depois de calculado o valor de C , este é posteriormente comparado com o valor tabelado, de acordo com a tabela A.2 em anexo. Para haver homogeneidade entre as variâncias, $C_{\text{calculado}}$ deve ser menor que C_{tabelado} . Caso contrário, $C_{\text{calculado}} > C_{\text{tabelado}}$, podendo afirmar-se que não existe homogeneidade entre as variâncias^[54].

Teste de Mandel

A linearidade pode ser avaliada de um modo estatístico, de acordo com a norma ISO 8466-1, pelo teste de Fisher/Snedecor ou teste de Mandel. A partir do conjunto de resultados obtidos (sinal instrumental vs. concentração), conjunto de pares ordenados, calcula-se a função de calibração linear e a função de calibração não-linear (fazendo-se o ajuste a um polinómio), de maneira a verificar qual a que melhor se ajusta aos pontos experimentais. Primeiro, devem ser calculados os respetivos desvios padrão residuais, $S_{y/x}$ e S_{y2} , do seguinte modo^[55]:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_i)^2}{N - 2}}$$

$$S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_{i2})^2}{N - 3}}$$

Em que:

N – número de padrões de calibração

y_i – sinal obtido para um padrão de determinada concentração

\bar{y}_i – sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão da mesma concentração

\bar{y}_{i2} – sinal estimado pela função de calibração polinomial do segundo grau para um padrão da mesma concentração

Calcula-se a diferença de variâncias (DS^2) através da seguinte equação:

$$DS^2 = (N - 2) * S_{y/x}^2 - (N - 3) * S_{y2}^2$$

Obtém-se o valor teste, VT , através da equação:

$$VT = \frac{DS^2}{S_{y2}^2}$$

O valor teste (VT) é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Fisher/Snedecor, para um grau de confiança de 95%, estabelecendo-se os seguintes critérios de decisão^[55]:

- a) Se $VT \leq F$: a função de calibração polinomial não conduz a um ajustamento significativamente melhor, e por isso, a função de calibração é linear.
- b) Se $VT > F$: a função de calibração é não linear e por isso a gama de trabalho deve ser reduzida tanto quanto possível de forma a cumprir a alternativa a). Caso não seja possível, deverá ser utilizada uma função de calibração não linear.

2.8.2. Limiares Analíticos

Quando se trabalha com concentrações relativamente baixas – *traces* – é importante o cálculo dos limiares analíticos. Estes são parâmetros importantes pois indicam a concentração a partir da qual é possível detetar ou quantificar o analito de interesse.

Quando o método envolve a utilização de uma curva de calibração linear, os limites de deteção e quantificação são calculados através do declive da reta e do desvio padrão residual ($S_{y/x}$).

2.8.2.1. Limite de Deteção

O limite de deteção é o teor mínimo a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável. Este limiar analítico corresponde à menor quantidade de substância a analisar que pode ser detetada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exato^[45].

Uma leitura inferior ao limite de deteção não significa a ausência do analito a medir, apenas se pode afirmar que, com uma probabilidade definida, a concentração do componente em causa será inferior a um certo valor^[45].

Caso o método envolva a utilização de uma calibração linear, o limite de deteção é calculado através do desvio padrão residual da curva de calibração, de acordo com a expressão^[45]:

$$L. D. = \frac{3,3 * S_{y/x}}{b}$$

Sendo o desvio padrão residual dado por^[56]:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - (a + bx_i))^2}{N - 2}}$$

Em que:

3,3 – valor de K, fator numérico para um nível de confiança de 99,7%

$S_{y/x}$ – desvio padrão residual da curva de calibração

a – ordenada na origem da reta de calibração

b – declive da curva de calibração

N – nº de leituras de padrões utilizados no traçado da curva de calibração

x_i – concentração dos padrões de calibração

y_i – valores do sinal instrumental

2.8.2.2. Limite de Quantificação

O limite de quantificação corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exatidão e precisão. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Após ter sido determinado este limiar, deve ser testado para averiguar se a exatidão e precisão conseguidas são satisfatórias, realizando-se um teste que consiste na passagem de uma série de padrões, cuja concentração é próxima ou igual ao limiar de quantificação^[45].

Caso o método envolva a utilização de uma reta de calibração, este limite é determinado por uma equação muito semelhante à anterior, apenas é utilizado um valor de K igual a 10, pois segundo as recomendações da IUPAC, o coeficiente de variação (desvio padrão a dividir pela média dos valores encontrados) para estes padrões não deve exceder 10%. Assim sendo, este calcula-se através da equação seguinte^[49].

$$L. Q. = \frac{10 * S_{y/x}}{b}$$

2.8.3. Sensibilidade

A sensibilidade permite avaliar a capacidade de um método (ou equipamento) para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. Assim, a sensibilidade é definida como sendo a derivada de primeira ordem da curva de calibração nessa zona de concentração. Deste modo, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho se a curva de calibração for definida por um modelo linear, e igual ao declive dessa reta^[47]. Um método é considerado sensível quando pequenas variações na concentração do analito, geram uma grande variação no sinal de resposta^[57], como se visualiza na figura 2.14.

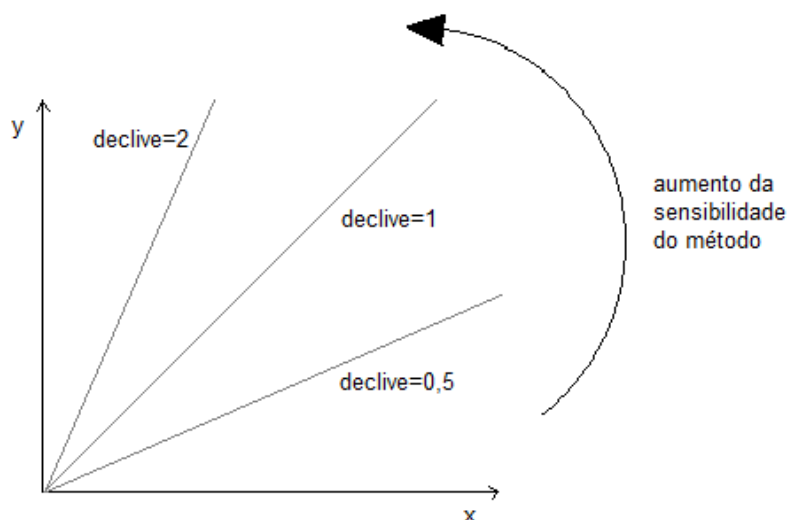


Figura 2.14 - Visualização do aumento da sensibilidade do método de acordo com o declive

2.8.4. Precisão

A precisão tem como objetivo avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas^[45].

Existem algumas medidas para avaliar esta dispersão, nomeadamente a repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade^[45]. No presente trabalho apenas seriam avaliados os parâmetros de repetibilidade e precisão intermédia.

2.8.4.1. Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, isto é, refere-se a ensaios efetuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, tais como: utilizando o mesmo laboratório, analista, equipamento, tipo de reagentes e curtos intervalos de tempo^[45].

Deve ser calculado o limite de repetibilidade (r) que representa o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio (X_i, X_{i-1}), obtidos nas condições acima referidas^[45].

Na prática aceitam-se os resultados de duas determinações efetuadas em condições de repetibilidade se $|X_i - X_{i-1}| \leq r$. Caso a amplitude entre os dois ensaios seja superior ao limite, dever-se-á, numa primeira fase, fazer uma análise crítica e, caso seja necessário, recorrer à repetição de ensaios. O limite de repetibilidade é dado pela equação^[45].

$$r = 2,8 * \sqrt{S_{ri}^2} = 2,8 * S_{ri}$$

S_{ri} representa o desvio padrão da repetibilidade associado aos resultados obtidos e é dado por:

$$S_{ri} = \sqrt{\frac{1}{n-1} * \sum_{k=1}^n (x_k - \bar{x})^2}$$

Em que:

n – número de ensaios efetuados

x_k – resultado individual obtido

\bar{x} – média aritmética dos resultados individuais obtidos

Para determinar a repetibilidade de um método no próprio Laboratório, efetuam-se uma série de medições ($n > 10$) sobre uma mesma amostra ou padrões, em condições de repetibilidade^[45].

Por outro lado, a repetibilidade pode ser expressa como o desvio padrão relativo, também denominado Coeficiente de Variação, parâmetro que permite avaliar a repetibilidade. O Coeficiente de Variação é expresso em percentagem e é dado pela expressão^[45]:

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} * 100$$

De modo a garantir a repetibilidade do método, este parâmetro não deve apresentar um valor superior a 5%^[58].

2.8.4.2. Precisão Intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, variando uma ou mais condições, tais como: os analistas, equipamentos ou épocas diferentes^[45].

Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo da precisão intermédia, existem vários métodos para determinação e controlo desse parâmetro. Um método simplificado para estimar a precisão intermédia baseia-se na execução de n medições ($n \geq 15$), em condições pré-definidas, sobre uma mesma amostra, amostras supostamente diferentes ou padrões^[57].

Tal como no ensaio da repetibilidade, também no estudo da precisão intermédia se utiliza o Coeficiente de Variação como parâmetro de avaliação de precisão.

Para determinar a precisão intermédia do método, efetuam-se 10 ensaios em replicado, em ensaio único, sobre a amostra, nas condições pré-definidas, e após uma semana efetuam-se mais 5 ensaios utilizando a mesma amostra que anteriormente^[45].

2.8.5. Exatidão

Este parâmetro é definido como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro. O termo exatidão, quando aplicado a uma série de resultados de ensaio, implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e componentes de erros sistemáticos. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de uma metodologia são, entre outros, o uso de materiais de referência certificados, participação em comparações inter-laboratoriais e realização de ensaios de recuperação. Para o estudo deste parâmetro exemplifica-se o processo por ensaios de recuperação^[57].

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo. As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta, conforme a faixa de trabalho usada no método. Convém que as amostras sejam analisadas em duplicado e em condições de repetibilidade^[57].

Assim, a recuperação é calculada através da expressão:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_R - C_A}{C_P} * 100$$

Em que:

C_R – concentração do analito na amostra fortificada

C_A – concentração do analito na amostra não fortificada

C_P – concentração do analito adicionada à amostra fortificada

O método é considerado exato quando se verificarem taxas de recuperação próximas de 100%. No caso de se tratarem de contaminantes alimentares, vários autores defendem que rendimentos de extração médios superiores a 50% são aceitáveis para análises de avaliação de risco^[59].

2.9.Diagnóstico e Resolução de Problemas (Diagrama de Ishikawa)

Quando se está perante um problema sério, é importante explorar todas as possíveis causas que possam estar na origem do problema, antes de começar a pensar na solução. Como referido no capítulo de Enquadramento e Motivação, existem diferentes ferramentas que permitem chegar à causa raiz de um problema, sendo o diagrama de Ishikawa a utilizada neste trabalho.

Os diagramas de causa/efeito (Ishikawa ou Espinha de Peixe) são uma ferramenta que permite visualizar e categorizar as potenciais causas do problema, em vez de apenas as que parecem mais óbvias, de modo a identificar as causas de origem^[60].

Existem seis categorias utilizadas para ajudar a desenvolver a construção destes diagramas. Estas são:

- Método
- Máquina
- Medição
- Meio-ambiente
- Material
- Mão-de-obra

Para a identificação de todas as causas possíveis é feita uma reunião de *brainstorming* de maneira a abordar o problema de diferentes pontos de vista, evitando a tendência para descartar muitos dos problemas menos óbvios.

3. Materiais e Métodos

O desenvolvimento da metodologia para a determinação e quantificação de PAH's nos óleos vegetais por UPLC, decorreu no laboratório da Qualidade da Sovena Consumer Goods, no Barreiro. Deste modo, foram utilizados os materiais e equipamentos disponíveis nestas instalações.

Nesta secção vão ser apresentados os materiais, equipamentos, solventes e reagentes, preparação de soluções, procedimento experimental e as condições operacionais.

3.1. Material e Equipamento

Para a realização do método experimental, foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos:

- Balança analítica com precisão de 0,0001 g (*Mettler Toledo Classic Plus AB-204-S/FAC*);
- Cartuchos de extração SPE (*Supelco – SupelMIP PAH's SPE Column 50 mg /3 mL*);
- Coluna C18 de fase reversa para PAH's com partículas de 5 µm e com dimensões 250x4,6 mm (*Waters*);
- Filtros de seringa de 4 mm de diâmetro e 0,2 µL de poro, membrana de Nylon, PP (*Whatman*);
- Material recorrente de laboratório;
- Microseringas de 1 e 250 µL (*Agilent Technologies*);
- Seringas descartáveis de 2 mL;
- Suporte de corrente de azoto (*Supelco*);
- Suporte para cartuchos (*Waters*);
- UPLC (*Waters Acquiy H-Class*);
- Vials âmbar de 2 mL;
- Vials de vidro transparente de 10 mL.

O equipamento UPLC é constituído por várias partes, como se verifica na figura 3.1. É constituído pelas bombas que fornecem ao sistema um fluxo em gradiente ou isocrático (1), o amostrador com injetor automático (2), os detetores de UV-VIS (3) e de Fluorescência (4), a coluna (5) e a zona dos solventes (6).

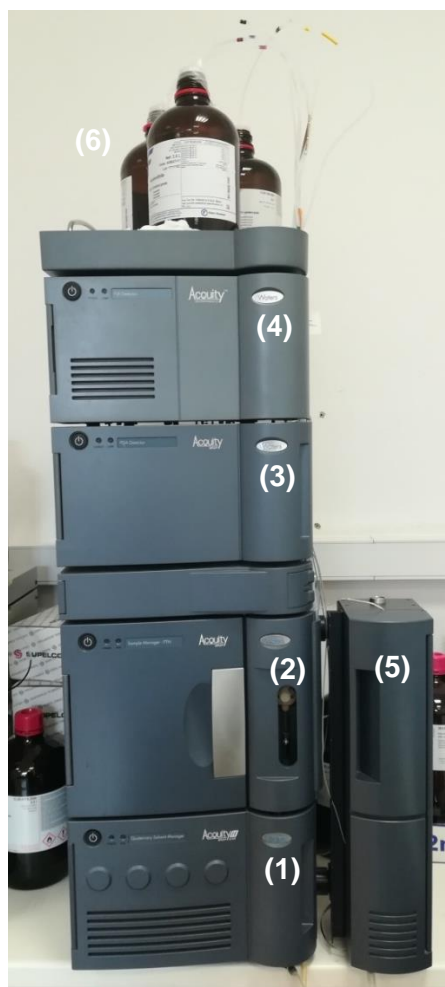


Figura 3.1 - Equipamento UPLC

Para a aquisição de dados pelo UPLC foi utilizado o *software* Empower.

3.2.Solventes e Reagentes

Para preparação das soluções, amostras e posterior análise cromatográfica, são utilizados os seguintes solventes/reagentes de grau HPLC:

- Acetato de etilo (*PanReac AppliChem*, 99,98% de pureza)
- Acetonitrilo (*Chem-Lab* e *FisherScientific* , 99,99% de pureza)
- Água (*FisherScientific*)
- Ciclo-hexano (*PanReac AppliChem*, 99,99% de pureza)
- n-heptano (*PanReac AppliChem*)
- Tetra-hidrofurano (*Chem-Lab*, 99,8% de pureza)

É utilizada uma corrente de azoto para evaporar o solvente e purificar a amostra a ser estudada, concentrando os PAH's extraídos.

Os solventes utilizados como fase móvel no UPLC são filtrados por filtros presentes na extremidade de cada linha de modo a impedir a entrada de impurezas indesejadas na coluna, assim como é feita a degaseificação das linhas, sempre que se liga o equipamento, se troca o frasco de solvente ou se lavam os filtros, com o objetivo de remover bolhas de ar que possam entrar na coluna e causar oscilações de pressão e problemas de estabilização na linha de base. Os filtros são lavados regularmente no ultrassom.

3.3.Preparação das Soluções – Padrão

Para a preparação das soluções-padrão, são necessários os padrões de PAH's abaixo listados:

- Benz(a)Pireno 10 µg/mL em Acetonitrilo (*Dr.Ehrenstorfer*)
- Benzo(a)Antraceno 10 µg/mL em Acetonitrilo (*Dr.Ehrenstorfer*)
- Benzo(b)Criseno 10 µg/mL em Acetonitrilo (*Dr.Ehrenstorfer*)
- Benzo(b)Fluoranteno 10 µg/mL em Acetonitrilo (*Dr.Ehrenstorfer*)
- Benzo(g,h,i)Perileno 10 µg/mL em Acetonitrilo (*Dr.Ehrenstorfer*)
- Benzo(k)Fluoranteno 10 µg/mL em Acetonitrilo (*Dr.Ehrenstorfer*)
- Criseno 100 g (*Fluka*)
- Dibenzo(a,h)Antraceno 10 µg/mL em Acetonitrilo (*Dr.Ehrenstorfer*)
- Indeno(1,2,3-cd)Pireno 10 µg/mL em Acetonitrilo (*Dr.Ehrenstorfer*)

Como os padrões em estudo são sensíveis à luz, as soluções são armazenadas no escuro em ambiente frio, nas respectivas embalagens originais. Antes de proceder às sucessivas diluições, as soluções padrão permaneceram no mínimo 1h à temperatura ambiente.

A forma mais comum de se fazer a calibração de um instrumento é através da curva analítica (ou curva de calibração). Para tal, é necessário proceder-se a sucessivas diluições, o mais próximo da realidade da amostra em estudo, de modo a obterem-se diferentes concentrações para cada PAH^[61]. A reta de calibração, executada para cada um dos oito PAH, vai ser utilizada para calcular a concentração de cada analito de interesse da amostra.

Assim, são feitas diluições na gama 10 µg/kg até 0,1 µg/kg (10 ppb e 0,1 ppb respetivamente), começando por diluir os PAH's padrão que vêm muito concentrados. Estes padrões são obtidos numa concentração 10 µg/mL e pretende-se obter uma concentração de 0,1 µg/mL, sendo esta a solução de partida (solução-mãe) para a realização da gama de diluições. O Criseno vem em sólido (pó), de modo que se deve proceder à sua diluição, adicionando-se 1 mg do padrão a um balão de 100 mL, perfazendo-se o resto com Acetonitrilo. Para este e os restantes PAH's, adiciona-se finalmente, 1 mL

de cada padrão a um balão de 100 mL, perfazendo o resto com Acetonitrilo para fazer a solução-mãe.

Neste processo, foi utilizado o método do padrão interno para correção de erros sistemáticos e aleatórios. Como padrão interno utilizou-se um composto de estrutura semelhante aos PAH's mas que não se encontra presente na matriz da amostra, o Benz(b)Criseno. Adiciona-se uma quantidade constante de padrão interno a cada amostra, quer de calibração, quer desconhecidas, e em vez de se basear a calibração na resposta absoluta do analito, a calibração usa, como resposta, a razão entre o analito e o padrão interno. Desta forma são corrigidas perdas de analito durante a preparação da amostra, corrigindo-se diferenças do volume de injeção. O uso do padrão interno serve também para certificar se realmente se estão a obter picos no tempo de retenção correto, verificar problemas como falta de força na bomba ou até problemas no detetor.

Para se proceder ao cálculo das diferentes diluições, utiliza-se a equação abaixo indicada, de modo a calcular qual o volume a retirar da solução-mãe e obter a gama de concentrações. As soluções são preparadas em balões volumétricos de 50 mL.

$$C_A * V_A = C_B * V_B$$

Em que:

C_A – concentração da solução padrão de partida

V_A – volume da solução padrão de partida

C_B – concentração que se pretende obter

V_B – volume final da solução

Utilizando a equação anterior, procedeu-se ao cálculo das diferentes diluições. Os valores obtidos estão representados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Volumes calculados para as diferentes concentrações

C_A (µg/kg)	V_A (mL)	C_B (µg/kg)	V_B (mL)
100	5	10	50
100	2,5	5	50
100	1	2	50
100	0,5	1	50
100	0,375	0,75	50
100	0,250	0,5	50
100	0,200	0,4	50
100	0,150	0,3	50
100	0,100	0,2	50
100	0,050	0,1	50

Para volumes inferiores a 0,5 mL, foi utilizada uma seringa de 250 µL para a realização das diluições.

Aquando da realização da curva de calibração do padrão I(1,2,3-cd)P, verificou-se que as concentrações que até ao momento estavam a ser utilizadas para os outros padrões, não podiam ser as escolhidas para este padrão, por este ser de difícil deteção. Assim, foi feita uma nova gama de concentrações de 0,7 – 10 ppb, apenas para este padrão, apresentada na tabela 3.2, de modo a ser possível a construção de uma curva de calibração, com, no mínimo 5 pontos.

Tabela 3.2 - Volumes calculados para a gama de concentrações do padrão I(1,2,3-cd)P

C_A (µg/kg)	V_A (mL)	C_B (µg/kg)	V_B (mL)
100	5	10	50
100	3,5	7	50
100	2,5	5	50
100	1	2	50
100	0,500	1	50
100	0,450	0,9	50
100	0,400	0,8	50
100	0,350	0,7	50

Foi escolhido o valor 0,7 ppb como a concentração mais baixa, pois quando se construiu a curva de calibração utilizando as concentrações da tabela 3.1, para a concentração 0,75 ppb já surgiam dificuldades de deteção e leitura.

3.4.Procedimento Experimental a Validar

No presente estudo, o método a validar consiste numa extração em fase sólida seguida de purificação dos diferentes componentes da mistura, utilizando cartuchos SupelMIP. Foram realizados os seguintes passos:

1. Preparar o cartucho SupelMIP eluindo, por ação da gravidade, o cartucho inteiro com 3 mL de ciclo-hexano. Passar vácuo (Atenção: Não deixar secar completamente);
2. Num balão de fundo plano de 10 mL, pesar 0,5 g de amostra + 1 mL de Ciclo-hexano (adicionar 0,5 µL de padrão interno) e adicionar ao cartucho;
3. Lavar o balão da amostra com Ciclo-hexano (2 mL) para arrastar os resíduos da amostra que ficaram no frasco. Adicionar novamente ao cartucho.
NOTA: o que fica nos copos despreza-se, ficando os PAH's na fase estacionária do cartucho;
4. Fazer a eluição, por ação da gravidade, dos PAH's com 3 mL de Acetato de Etilo para um *vial* de 10 mL;
5. Evaporar até à secura o eluato de Acetato de Etilo obtido a partir do cartucho purgando com uma corrente de azoto;
6. Dissolver o resíduo com 200 µL de uma mistura de Acetonitrilo:Tetrahydrofurano (90:10);
7. Recolher para uma seringa de 2 mL. Filtrar através de um filtro de seringa e verter completamente a mistura para um *vial*.

O equipamento UPLC, utilizado na parte final da experiência para quantificar os compostos de interesse, deve ser ligado numa ordem específica. Primeiro deve ligar-se o amostrador (Auto Sampler), seguindo-se as bombas. Só depois destes estarem ligados e de estar a passar solvente na coluna, liga-se o detetor de Fluorescência.

Para uma correta utilização do equipamento, a cada utilização é necessário purgar as linhas de solvente, para, tal como referido anteriormente, evitar bolhas de ar na coluna. De modo a obter resultados o mais corretos possível, entre amostras é feita a lavagem da seringa.

3.5. Condições Operacionais

Os PAH's foram detetados por fluorescência, utilizando inicialmente os comprimentos de onda de excitação e emissão estabelecidos na norma ISO 15753:2016. Foram utilizados quatro canais (A, B, C e D) com valores fixos de comprimento de onda de excitação e emissão, apresentados na tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Comprimentos de onda de deteção

Componentes	Tempo de Retenção (min)	Canal FLR	$\lambda_{\text{excitação}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emissão}}$ (nm)
Benzo(a)Antraceno	3,5	B	270	385
Criseno	4,0			
Benzo(b)Fluoranteno	4,8	A	256	446
Benzo(k)Fluoranteno	5,8	D	292	410
Benzo(a)Pireno	6,6			
Dibenzo(a,h)Antraceno	8,5			
Benzo(g,h,i)Perileno	9,3			
Indeno(1,2,3-cd)Pireno	11,0	C	274	507
Benzo(b)Criseno	14,5	D	292	410

Apesar dos valores fixos pela norma para os comprimentos de onda de emissão e excitação, o padrão Benzo(b)Fluoranteno apresentou uma área maior quando detetado com o canal D, como se verá explicado no capítulo 4.1 de Pré-Requisitos, de maneira que, mantiveram-se fixos os quatro canais, mas este padrão foi analisado através do canal D, contrariamente à norma referida inicialmente.

Em relação ao volume de injeção, temperatura do amostrador automático e fluxo, mantiveram-se as condições do método.

Algumas das condições operacionais foram semelhantes às da norma ISO 15753:2016. Nesta norma, a temperatura da coluna é mantida a 25°C no decorrer da análise, ao passo que na realização deste

trabalho, foi aumentada para 26°C. A temperatura do laboratório encontrava-se muitas das vezes a temperaturas superiores a 25°C, o que impedia a coluna de se manter à temperatura especificada na norma, pois a coluna apenas tem sistema de aquecimento e não de arrefecimento, de modo que foi aumentada a temperatura para 26°C para se obterem resultados mais estáveis. Oscilações na temperatura vão resultar em diferentes tempos de retenção do padrão a analisar, de maneira que com este aumento de apenas 1°C na temperatura da coluna, é possível evitar essas diferenças nos tempos de retenção e forma do pico.

Conforme o que foi analisado e concluído acima, assim como as conclusões a que se chegou no capítulo de pré-requisitos (4.1), apresentado de seguida, as condições operacionais finais são as seguintes:

- Volume de Injeção: 40 µL
- Temperatura da Coluna: 26°C
- Temperatura do Amostrador Automático: 20°C
- Gradiente de Eluição: Isocrático, 100% Acetonitrilo
- Fluxo de Eluição: 1,5 mL/min

Tabela 3.4 - Comprimentos de onda de deteção finais (diferentes da norma apenas para o composto BbF)

Componentes	Tempo de Retenção (min)	Canal FLR	$\lambda_{\text{excitação}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emissão}}$ (nm)
Benzo(a)Antraceno	3,5	B	270	385
Criseno	4,0			
Benzo(b)Fluoranteno	4,8	D	292	410
Benzo(k)Fluoranteno	5,8	D	292	410
Benzo(a)Pireno	6,6			
Dibenzo(a,h)Antraceno	8,5			
Benzo(g,h,i)Perileno	9,3	C	274	507
Indeno(1,2,3-cd)Pireno	11,0			
Benzo(b)Criseno	14,5			
		D	292	410

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

4. Resultados e Discussão

4.1. Pré-Requisitos

Antes da realização da validação do método, foram realizadas experiências iniciais de modo a saber qual a concentração de padrão interno a adicionar, visto esta ter de ser constante, tanto na amostra como nas análises com os padrões, assim como o fluxo da fase móvel, se deve ser gradiente ou isocrático e qual a percentagem de cada solvente em caso de fluxo gradiente.

É de notar que, a partir deste capítulo, as concentrações vão ser expressas em ppb apenas para facilitar e porque no decorrer do trabalho experimental foi sempre utilizado essa unidade para referir concentrações.

Para o cálculo da concentração de padrão interno, fez-se um teste em que se injetou a concentração máxima a usar nas curvas de calibração, 10 ppb, de cada padrão e 10 ppb de padrão interno. Verificou-se que para a mesma concentração, havia picos de alguns padrões com áreas superiores à do padrão interno. Deste modo, aumentou-se a concentração do padrão interno para 20 ppb, para dar à partida uma boa margem, visto as áreas maiores apresentarem o dobro do valor da área do padrão interno. Feito o teste, verificou-se ainda assim que alguns padrões apresentavam áreas muito semelhantes ou um pouco maiores que as do padrão interno. Finalmente, foi aumentada a concentração de P.I. para 25 ppb, verificando-se um bom valor de concentração a utilizar, pois as áreas de todos os picos apresentaram-se menores que a do padrão interno. Este teste serviu de comparação, pois para a mesma concentração, há picos que apresentam maior, ou menor área, e assim foi possível garantir que se escolhia uma concentração de padrão interno que tivesse uma área sempre maior que a maior concentração de qualquer padrão. Obteve-se o resultado apresentado na figura 4.1, em que as áreas respetivas a cada pico estão representadas na tabela 4.1. A linha vermelha representa o canal A, a azul-escuro representa o Canal B, a linha preta o Canal C e a verde o Canal D.

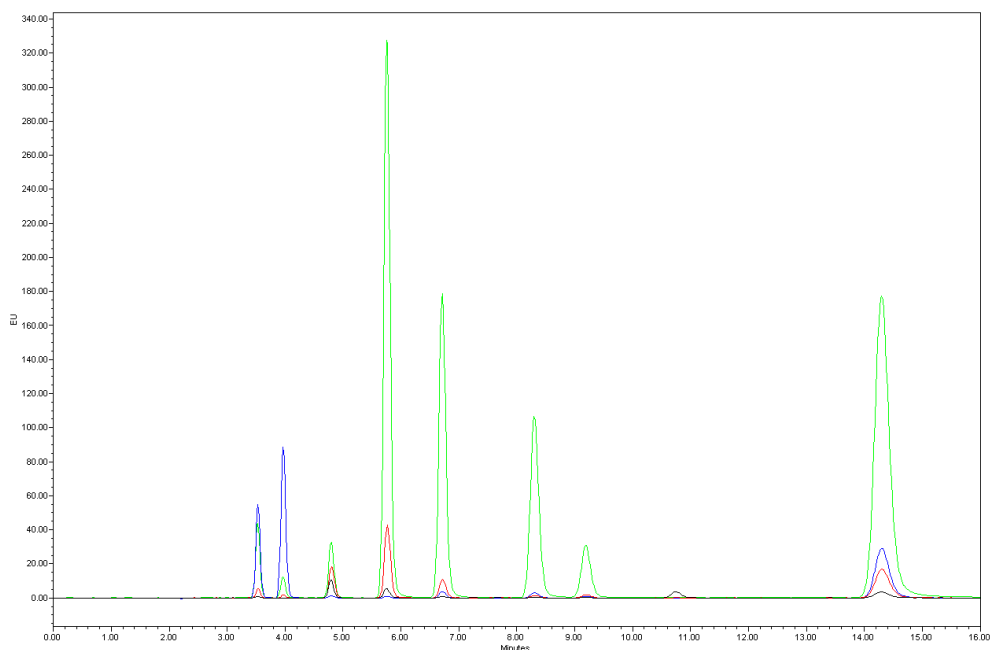


Figura 4.1 - Cromatograma dos 8 PAH's (10 ppb) mais padrão interno (25 ppb) com fluxo isocrático 100% Acetonitrilo

Tabela 4.1 - Áreas dos 8 PAH's (10 ppb) mais padrão interno (25 ppb)

Composto	Tempo de retenção (min)	Área do pico
BaA	3,50	2 974 306
CHR	4,00	5 346 641
BbF	4,80	1 260 811
BkF	5,75	24 955 252
BaP	6,70	15 129 446
D(ah)A	8,30	11 274 417
B(ghi)P	9,20	3 391 611
I(123cd)P	10,70	465 277
BbC	14,30	31 324 821

Deste modo, a concentração escolhida de padrão interno a adicionar a cada amostra e a cada um dos oito PAH's é de 25ppb.

Com este teste verificou-se que o padrão Benzo(b)Fluoranteno era detetado mais pelo Canal D do que pelo Canal A, este sendo o canal com valores de comprimento de onda de excitação e emissão especificados apenas para esse composto e que está de acordo com a norma ISO 15753. Assim, foi feito um varrimento aos comprimentos de onda de excitação e emissão deste padrão, de maneira a determinar os seus novos valores. Analisando os espectros de emissão e excitação, retiram-se os valores de comprimento de onda para o qual o sinal é maior, $\lambda_{\text{emissão}} = 437 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{excitação}} = 350 \text{ nm}$, como se pode verificar pelos gráficos das figuras B.2 e B.4, respetivamente, em anexo. Leu-se

novamente o padrão BbF agora com estes novos comprimentos de onda, mas novamente se verificou, pelo gráfico da figura B.5 em anexo, que o canal D foi o que apresentou maior sinal. Assim, vão ser utilizados apenas três canais, sendo este padrão analisado pelo canal D.

Por fim, foi determinado o gradiente de fase móvel, sendo testadas diferentes percentagens de Acetonitrilo e Água de modo a perceber qual a melhor maneira de separar simultaneamente os nove picos do cromatograma no menor tempo de análise. Inicialmente, foram testados dois tipos de gradiente já utilizados no método (tabelas B.1 e B.2 em anexo), que em princípio garantiam a separação de todos os picos. Tal não levou aos resultados esperados, pois apesar de os picos se apresentarem separados, a linha de base não estabilizava, como se verifica pelos gráficos dos cromatogramas finais representados nas figuras B.6 e B.7 em anexo. Fazendo também alterações na temperatura da coluna, leva à separação dos picos, pois esta afeta o tempo de retenção dos compostos,^[62] mas neste trabalho apenas se vai fazer variar o tipo de fluxo.

Finalmente, de maneira a criar um novo gradiente, tentando aproveitar parte dos que foram utilizados no método, recorreu-se a equações específicas. Como tal, é possível calcular o tempo de gradiente, que é o tempo necessário para aumentar a composição do solvente mais forte, representado por t_g na reta da figura 4.2.

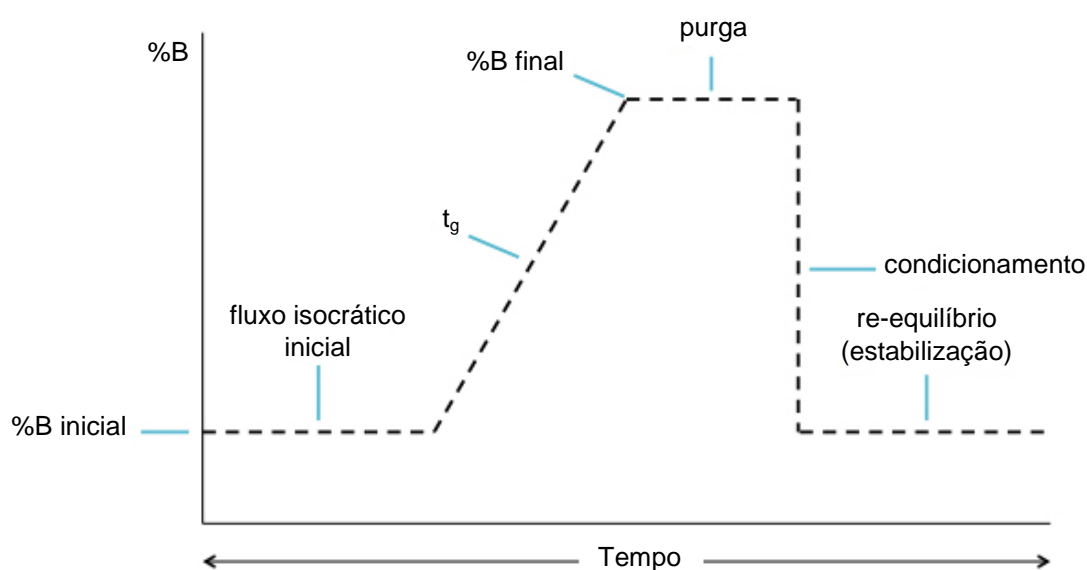


Figura 4.2 - Parâmetros de eluição por gradiente^[adaptado de 63]

Assim, o tempo de gradiente é dado através da equação seguinte:

$$t_g = 1,15 * S * k' * \Delta\Phi * V_m / F$$

Em que V_m é o volume da coluna e é dado pela equação:

$$V_m \approx 0,5 * L * d_c^2$$

S – fator forma, ao qual é atribuído normalmente o valor 4, quando o valor verdadeiro é desconhecido^[64]

k' – fator de retenção médio, no qual 5 é considerado um valor ótimo^[64]

$\Delta\Phi$ – variação da composição orgânica do gradiente

F – fluxo da fase móvel

Assim, para um gradiente que varia entre os 85-95% B (variação que foi utilizada no método), em que B representa o solvente Acetonitrilo, usando uma coluna 250 mm x 4.6 mm a um fluxo de 1,5 mL/min, o tempo de gradiente seria:

$$t_g = 1,15 * 4 * 5 * 0,10 * (0,5 * 250 * 4,6^2) / 1,50 = 4,1 \text{ min}$$

Também é possível calcular o tempo de equilíbrio, que consiste no tempo final, necessário para a coluna estabilizar nas condições iniciais de %B. Este tempo normalmente é calculado como um múltiplo do volume interno da coluna, sendo 10x o múltiplo normalmente utilizado^[64]. Assim, o tempo de estabilização seria:

$$t_E = 10 * (0,5 * 250 * 4,6^2) \approx 26 \text{ min}$$

Aproveitando os dados do gradiente do método, e alterando dois tempos, o de gradiente e o de estabilização (final), obteve-se a tabela B.3 representada em anexo.

Ainda assim, não foi possível obter estabilização da linha de base, como se verifica pelo gráfico da figura B.8 em anexo, de maneira que se começou por analisar um fluxo isocrático em vez de gradiente, visto este último levar a alterações na linha de base.

Por fim, como se verificava que um fluxo em gradiente levava a instabilidades na linha de base, optou-se por começar do zero, utilizando um fluxo isocrático com 100% Acetonitrilo e ir fazendo ajustes onde fosse necessário uma separação dos picos. Com isto, verificou-se que este resultava numa boa separação dos picos e verificava-se estabilização da linha de base. A utilização deste fluxo isocrático é vantajoso porque permite reduzir o tempo de corrida em 28 min, comparando com o tempo de corrida do método anteriormente utilizado.

O fluxo utilizado pelo método é de 1,5 mL/min, sendo continuado a utilizar esse valor ao longo deste trabalho.

Através destes testes iniciais, foi possível determinar os parâmetros necessários ao arranque do trabalho. Para concluir, a concentração do padrão interno foi de 25 ppb e a eluição final é com fluxo isocrático com 100% Acetonitrilo.

4.2. Validação

4.2.1. Curva de Calibração

Para a construção da curva de calibração foram preparadas soluções-padrão de concentrações 10 ppb, 5 ppb, 2 ppb, 1 ppb, 0,75 ppb, 0,5 ppb, 0,4 ppb, 0,3 ppb, 0,2 ppb e 0,1 ppb, para cada PAH, a partir de uma solução-mãe de 100 ppb. A cada uma destas concentrações foi adicionada uma concentração de 25 ppb de padrão Benz(b)Criseno – padrão interno. Para o padrão Indeno(1,2,3-cd)Perileno não foi possível construir a curva de calibração com os valores de concentração pré-estabelecidos, como referido na secção 3.3, de maneira que a gama de soluções teve de ser reduzida e alterada, construindo-se a curva com os valores da tabela 3.2. Os dados para obtenção das curvas de calibração encontram-se nas tabelas C.1 a C.8 em anexo.

Assim, para cada PAH obtiveram-se as seguintes curvas de calibração:

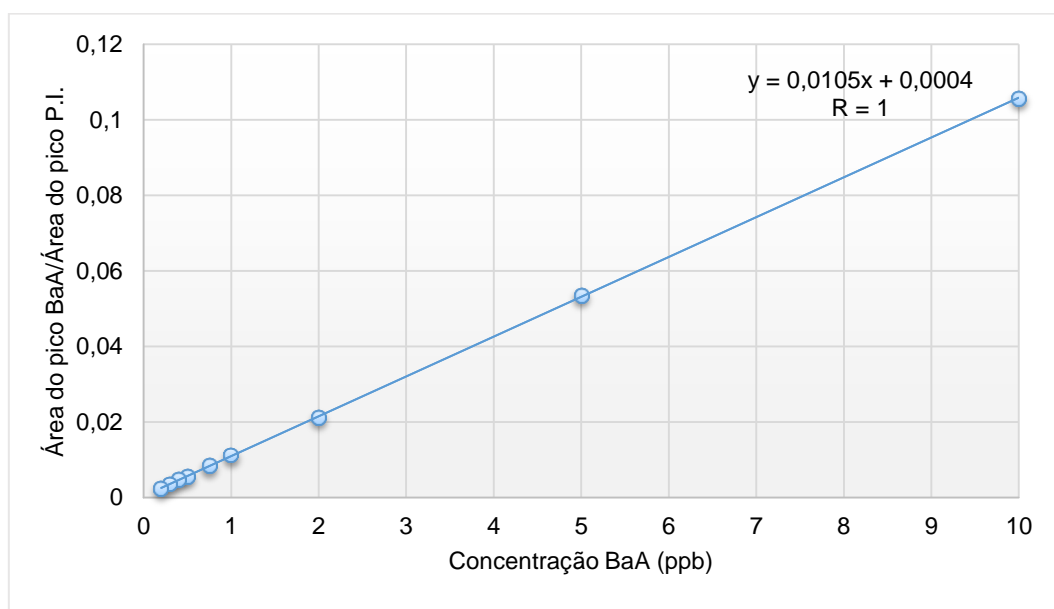


Figura 4.3 - Curva de calibração para o composto BaA

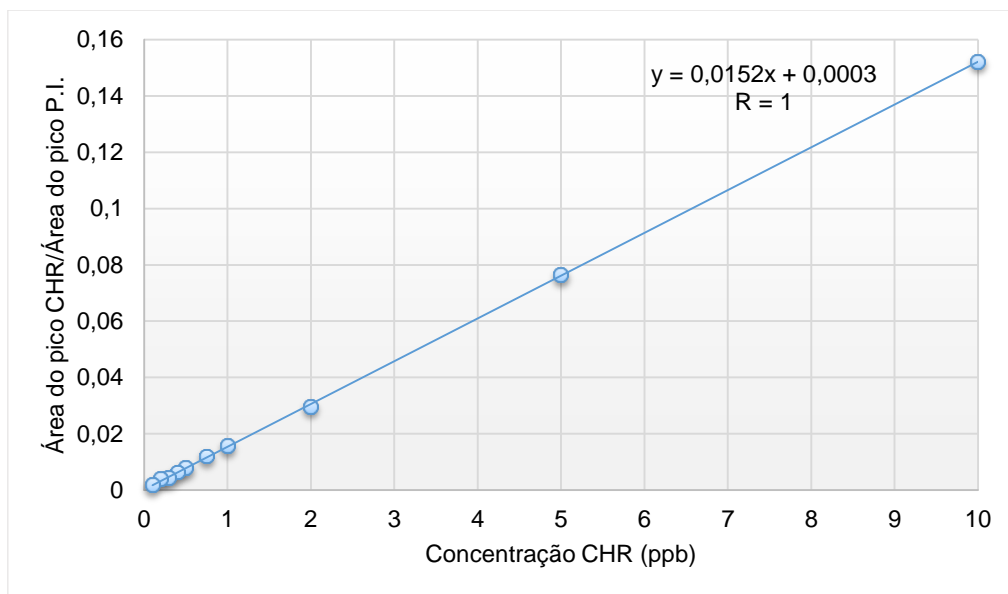


Figura 4.4 - Curva de calibração para o composto CHR

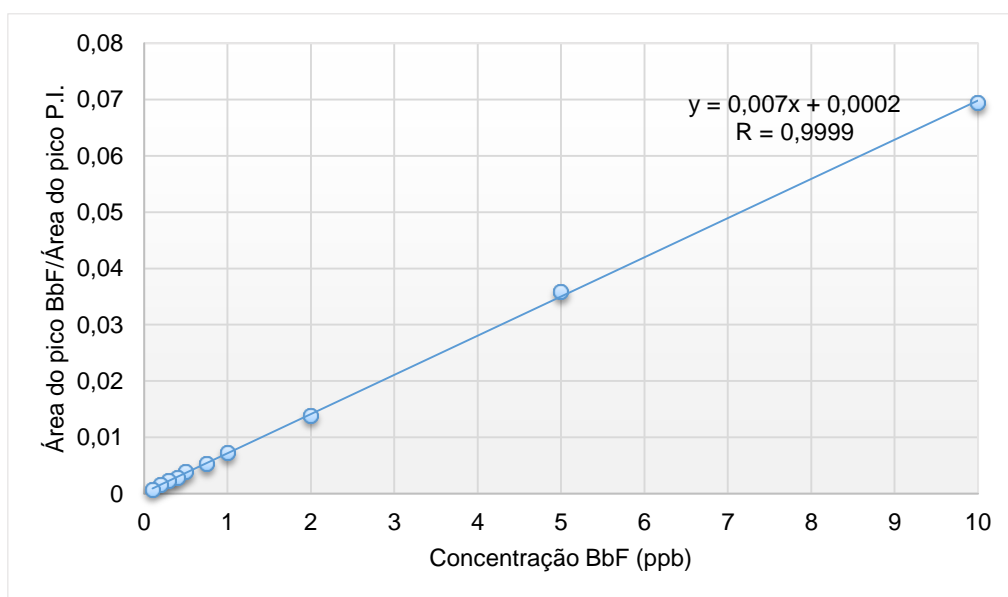


Figura 4.5 - Curva de calibração para o composto BbF

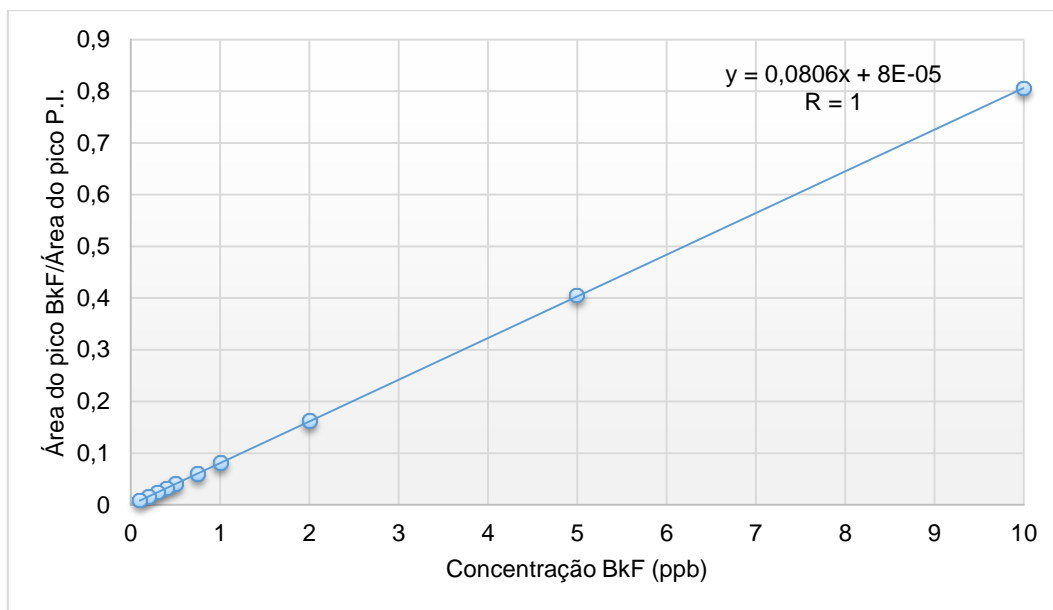


Figura 4.6 - Curva de calibração para o composto BkF

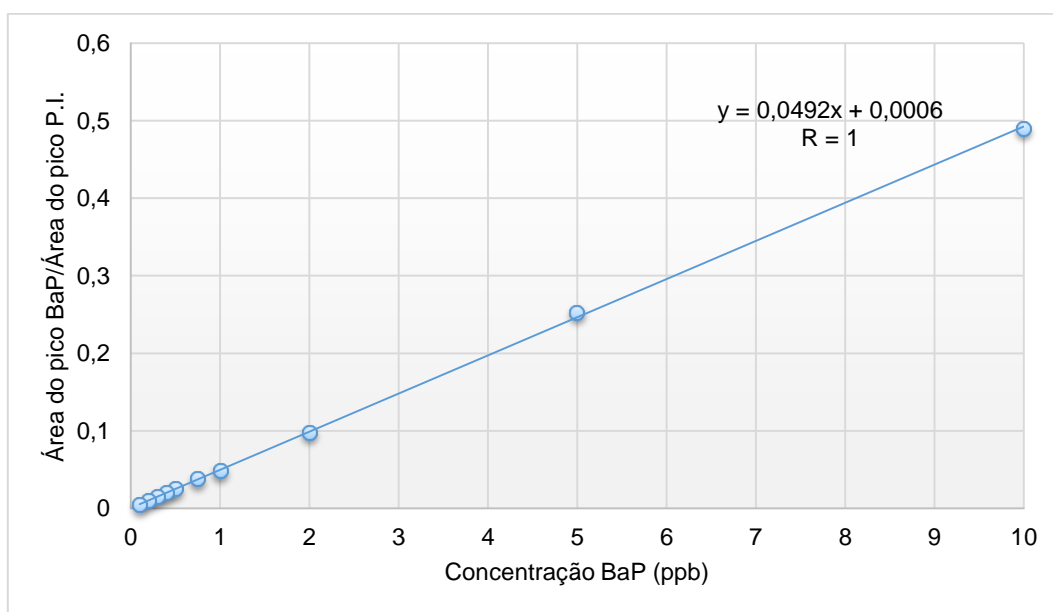


Figura 4.7 - Curva de calibração para o composto BaP

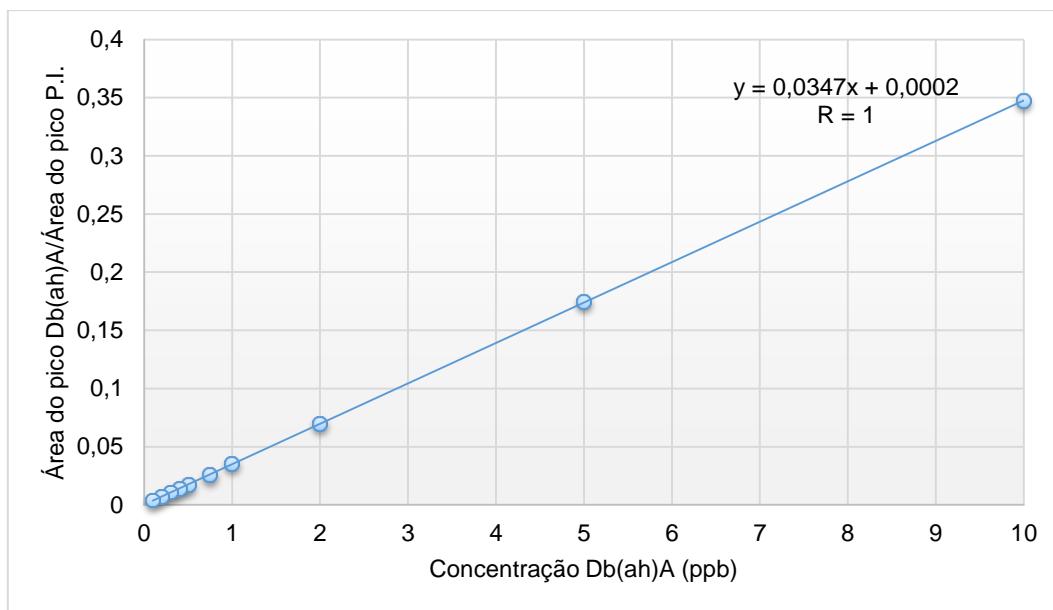


Figura 4.8 - Curva de calibração para o composto Db(a,h)A

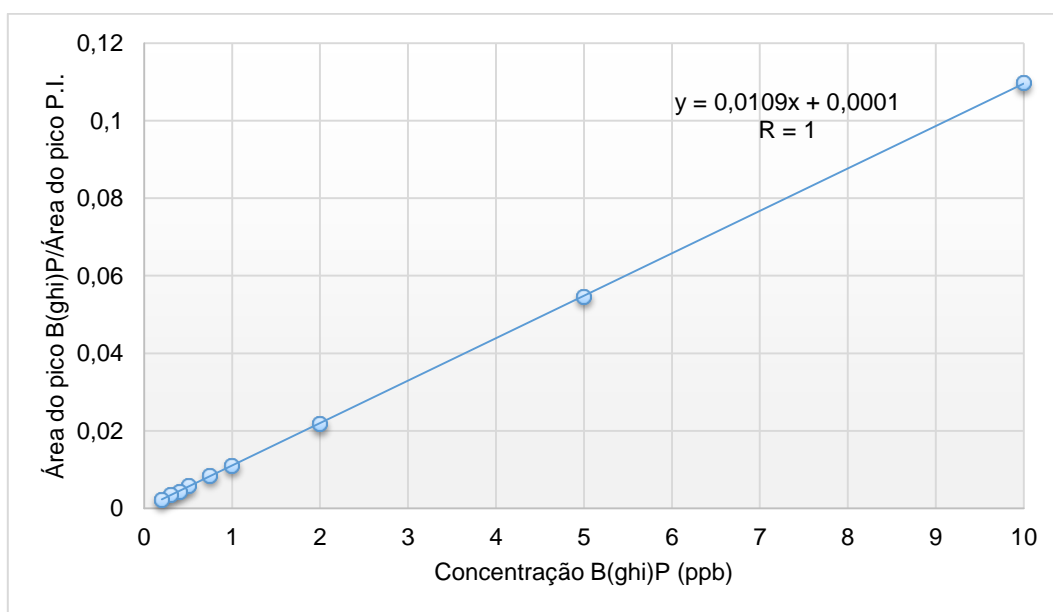


Figura 4.9 - Curva de calibração para o composto B(g,h,i)P

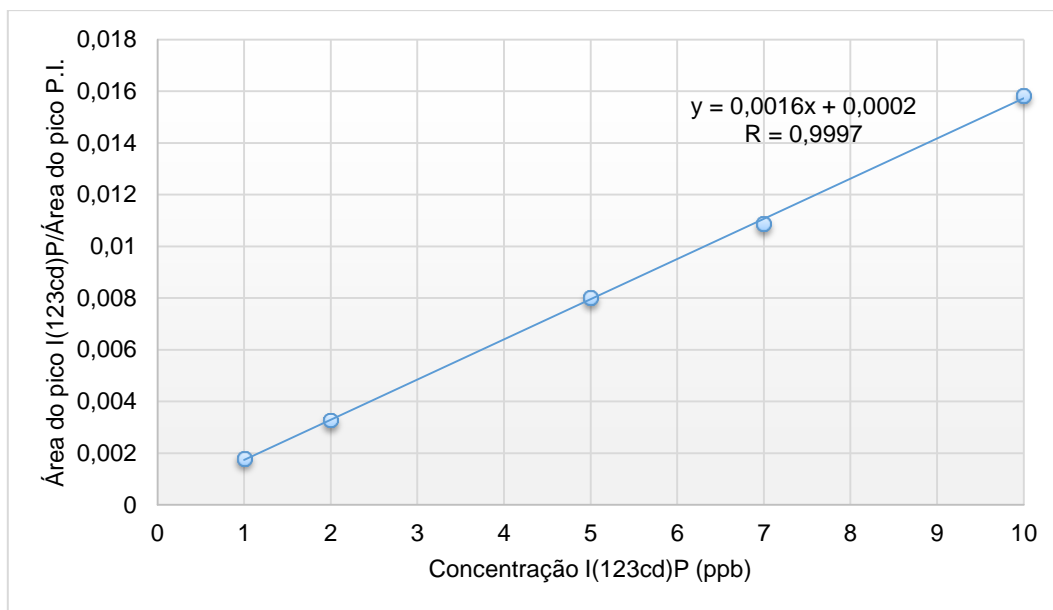


Figura 4.10 - Curva de calibração para o composto I(1,2,3-cd)P

Como se verifica, todas as curvas de calibração apresentam um coeficiente de correlação superior a 0,995, pelo que o modelo de regressão linear é considerado válido para os 8 PAH's.

4.2.1.1. Gama de Trabalho

Para a construção da gama de trabalho, realizaram-se dez replicações da solução menos concentrada (primeiro padrão da calibração) e da mais concentrada (último padrão da calibração) e analisaram-se as variâncias de ambas. Para a solução menos concentrada, utilizou-se o valor do limite de quantificação (L.Q.), calculado através da equação da secção 2.8.2.2 quando se construíram as curvas de calibração.

Sendo o Limite de Quantificação o ponto mais baixo da gama de trabalho, sempre que fosse necessário encurtar a gama, alterava-se o limite superior e nunca o inferior, mantendo sempre como limite inferior o L.Q.

As gamas de trabalho variam conforme o tipo de composto devido aos diferentes valores de resposta, para a mesma concentração, de modo que estas tiveram que ser ajustadas individualmente, obtendo-se os resultados apresentados na tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Gama de trabalho dos 8 PAH's

Composto	Valor experimental PG	Distribuição F de Fisher	Limite superior	Limite inferior (L.Q.)
BaA	8,00	10,56	2	0,2
CHR	3,17		2	0,3
BbF	1,46		10	0,5
BkF	6,80		10	0,1
BaP	9,67		2	0,3
Db(a,h)A	2,08		2	0,1
B(g,h,i)P	11,71		10	0,2
I(1,2,3-cd)P	1,57		10	0,9

Pela análise da tabela, considerando 10,56 como valor crítico a um nível de confiança de 99%, para $N - 1 = 9$ graus de liberdade, verifica-se que $PG < F$ para todos os compostos, menos o Benzo(g,h,i)Perileno. A gama de trabalho deste composto não pôde ser concluída devido aos problemas que ocorreram simultaneamente no equipamento. Assim, conclui-se que a diferença entre as variâncias não é significativa (para sete dos oito PAH's), de maneira que a gama de concentrações para cada composto, são as apresentadas na tabela acima.

4.2.1.2. Linearidade

Apesar das curvas estudadas inicialmente apresentarem um coeficiente de correlação aceitável, não é o suficiente para garantir linearidade. Esta vai ser avaliada recorrendo ao teste de RIKILT, análise de resíduos, áreas normalizadas e teste de Mandel.

Teste de RIKILT

Para este teste foram utilizadas as equações apresentadas na secção 2.8.1.2, obtendo-se os resultados seguintes:

Tabela 4.3 - Valores do teste de RIKILT para o padrão BaA

X_i	Y_i	Y_i/X_i	Valor médio (Y_i/X_i)	$((Y_i/X_i)/\text{Valor médio } (Y_i/X_i)) * 100\%$
0,2	0,0024	0,0119	0,0114	104
0,3	0,0035	0,0118		104
0,4	0,0048	0,0119		104
0,5	0,0056	0,0113		99
0,75	0,0084	0,0112		98
1	0,0112	0,0112		98
2	0,0212	0,0106		93

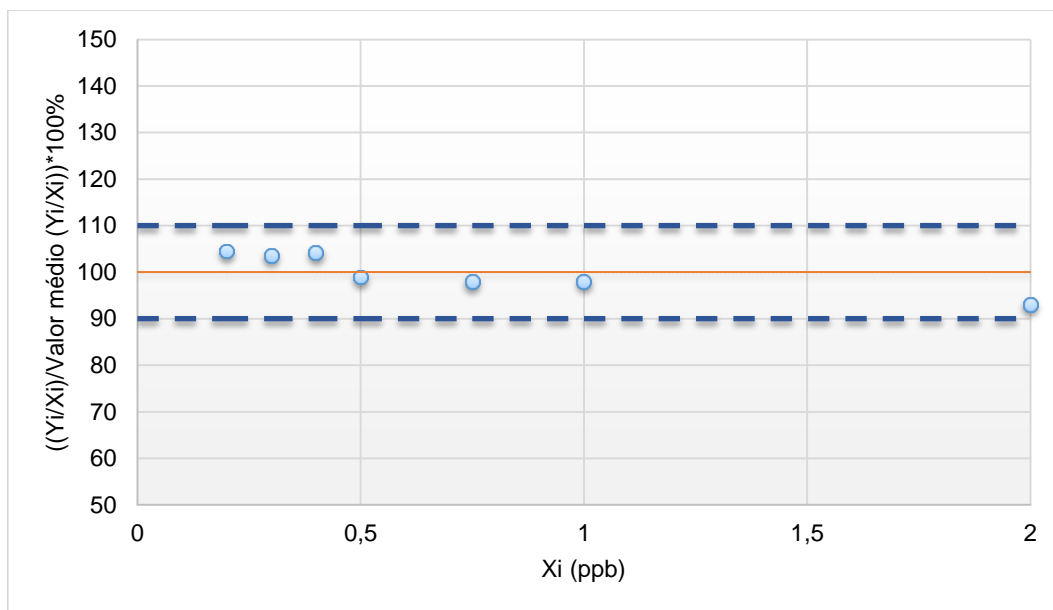


Figura 4.11 - Teste de RIKILT para o composto BaA

Tabela 4.4 - Valores do teste de RIKILT para o padrão CHR

Xi	Yi	Yi/Xi	Valor médio (Yi/Xi)	((Yi/Xi)/Valor médio (Yi/Xi))*100%
0,3	0,0043	0,0142	0,0154	92
0,4	0,0063	0,0158		103
0,5	0,0079	0,0158		103
0,75	0,0120	0,0160		104
1	0,0156	0,0156		102
2	0,0296	0,0148		96

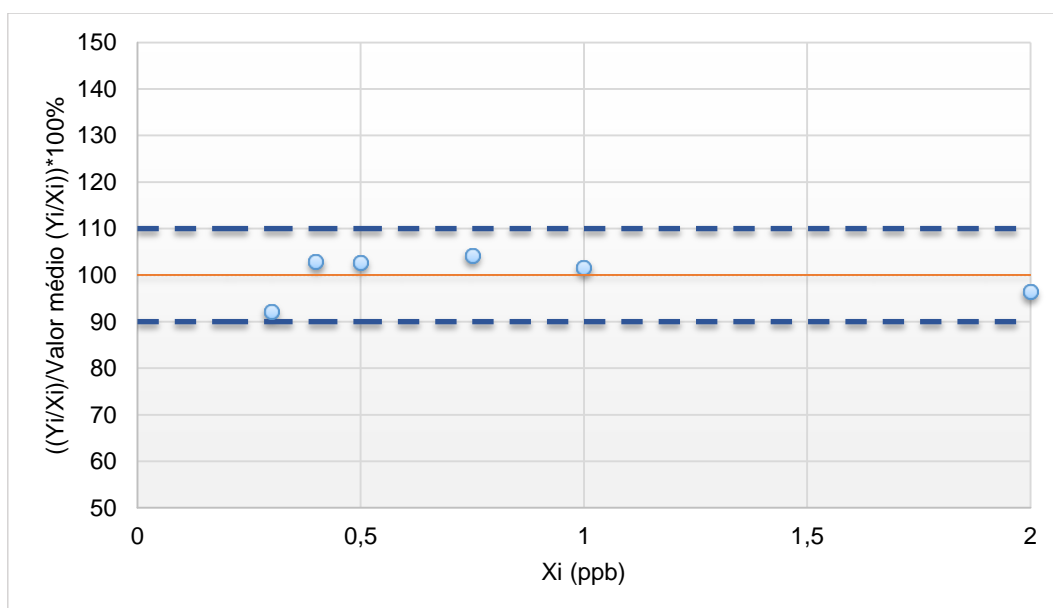


Figura 4.12 - Teste de RIKILT para o composto CHR

Tabela 4.5 - Valores do teste de RIKILT para o padrão BbF

Xi	Yi	Yi/Xi	Valor médio (Yi/Xi)	((Yi/Xi)/Valor médio (Yi/Xi))*100%
0,5	0,0039	0,0078	0,0072	109
0,75	0,0053	0,0071		98
1	0,0073	0,0073		101
2	0,0139	0,0070		97
5	0,0359	0,0072		99
10	0,0694	0,0069		96

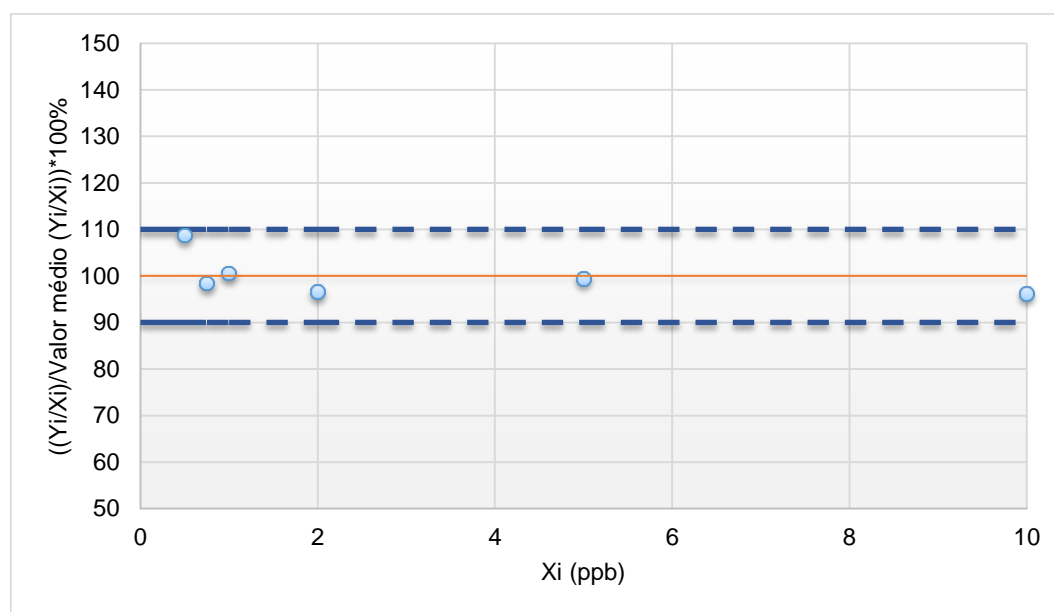


Figura 4.13 - Teste de RIKILT para o composto BbF

Tabela 4.6 - Valores do teste de RIKILT para o padrão BkF

Xi	Yi	Yi/Xi	Valor médio (Yi/Xi)	((Yi/Xi)/Valor médio (Yi/Xi))*100%
0,1	0,0084	0,0838	0,0808	104
0,2	0,0158	0,0790		98
0,3	0,0242	0,0806		100
0,4	0,0321	0,0802		99
0,5	0,0401	0,0802		99
0,75	0,0599	0,0800		99
1	0,0813	0,0813		101
2	0,1617	0,0809		100
5	0,4055	0,0811		100
10	0,8066	0,0807		100

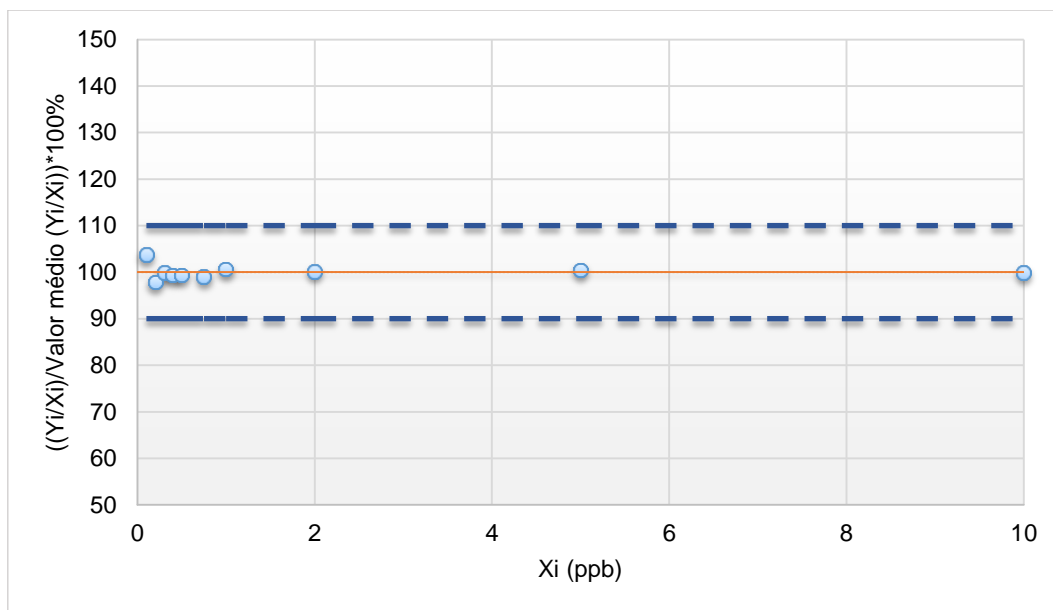


Figura 4.14 - Teste de RIKILT para o composto BkF

Tabela 4.7 - Valores do teste de RIKILT para o padrão BaP

Xi	Yi	Yi/Xi	Valor médio (Yi/Xi)	$((Y_i/X_i)/\text{Valor médio } (Y_i/X_i)) \cdot 100\%$
0,2	0,0103	0,0515	0,0494	104
0,3	0,0150	0,0499		101
0,4	0,0200	0,0492		100
0,5	0,0246	0,0491		99
0,75	0,0374	0,0499		101
1	0,0477	0,0477		96
2	0,0969	0,0484		98

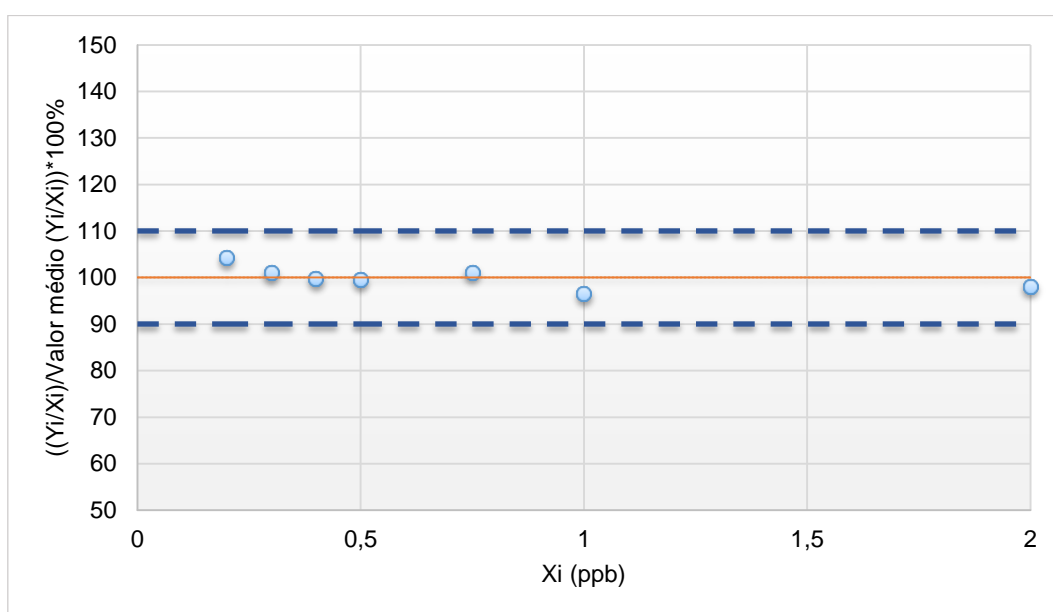


Figura 4.15 - Teste de RIKILT para o composto BaP

Tabela 4.8 - Valores do teste de RIKILT para o padrão Db(a,h)A

Xi	Yi	Yi/Xi	Valor médio (Yi/Xi)	((Yi/Xi)/Valor médio (Yi/Xi))*100%
0,1	0,0039	0,0391	0,0355	110
0,2	0,0071	0,0356		100
0,3	0,0108	0,0360		101
0,4	0,0137	0,0342		96
0,5	0,0172	0,0343		97
0,75	0,0260	0,0345		97
1	0,0355	0,0355		100
2	0,0699	0,0350		98

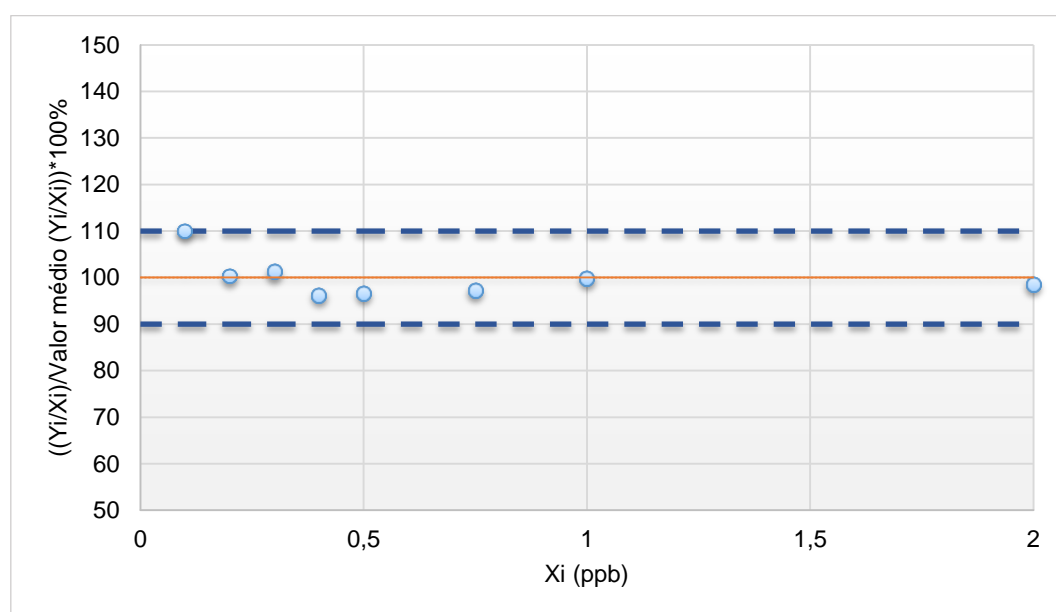


Figura 4.16 - Teste de RIKILT para o composto Db(a,h)A

Tabela 4.9 - Valores do teste de RIKILT para o padrão B(g,h,i)P

Xi	Yi	Yi/Xi	Valor médio (Yi/Xi)	((Yi/Xi)/Valor médio (Yi/Xi))*100%
0,2	0,0023	0,0116	0,0112	104
0,3	0,0035	0,0116		103
0,4	0,0043	0,0108		97
0,5	0,0057	0,0115		102
0,75	0,0086	0,0114		102
1	0,0111	0,0111		99
2	0,0218	0,0109		97
5	0,0546	0,0109		98
10	0,1097	0,0110		98

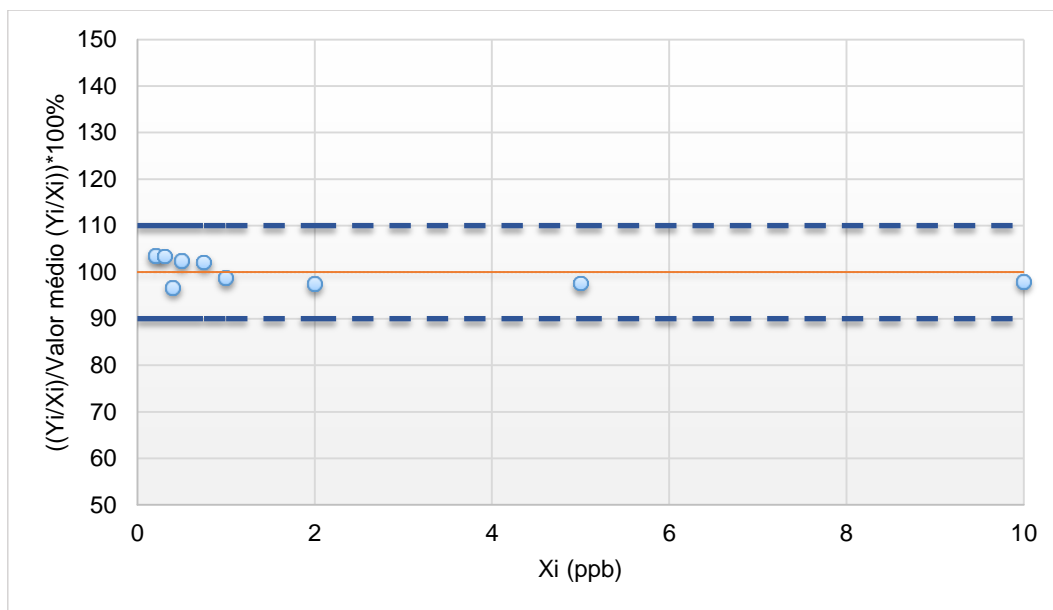


Figura 4.17 - Teste de RIKILT para o composto B(g,h,i)P

Tabela 4.10 - Valores do teste de RIKILT para o padrão I(1,2,3-cd)P

X_i	Y_i	Y_i/X_i	Valor médio (Y_i/X_i)	$((Y_i/X_i)/\text{Valor médio } (Y_i/X_i))*100\%$
0,9	0,0014	0,0016	0,0016	98
1	0,0018	0,0018		110
2	0,0033	0,0016		100
5	0,0080	0,0016		98
7	0,0109	0,0016		95
10	0,0158	0,0016		97

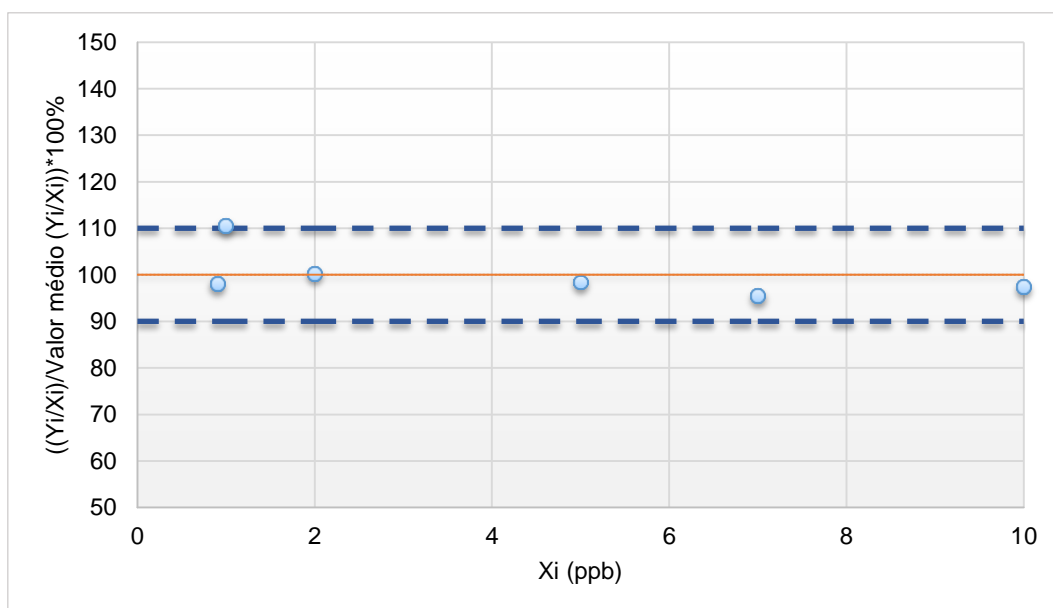


Figura 4.18 - Teste de RIKILT para o composto I(1,2,3-cd)P

Como se verifica que cada ponto da calibração se situa entre os 90% e os 110%, para as retas de todos os padrões, admite-se que existe linearidade do método, para os oito PAH's.

Análise de Resíduos

a. Normalidade

Para a construção deste capítulo da Normalidade, foram utilizados os dados das tabelas D.1 a D.8 em anexos. Inicialmente, foi avaliada a normalidade através da construção da reta de Frequências Acumuladas Observadas em função dos Resíduos por ordem. Também se transformaram os pontos em dados normalizados, para uma fácil visualização de *outliers*. Caso os pontos que, pela análise dos dados normalizados, se verificassem fora dos limites -2 e 2, denominados *outliers*, seriam excluídos do gráfico e dos cálculos posteriores. Tal não se verificou pois todos os pontos se apresentaram dentro dos limites.

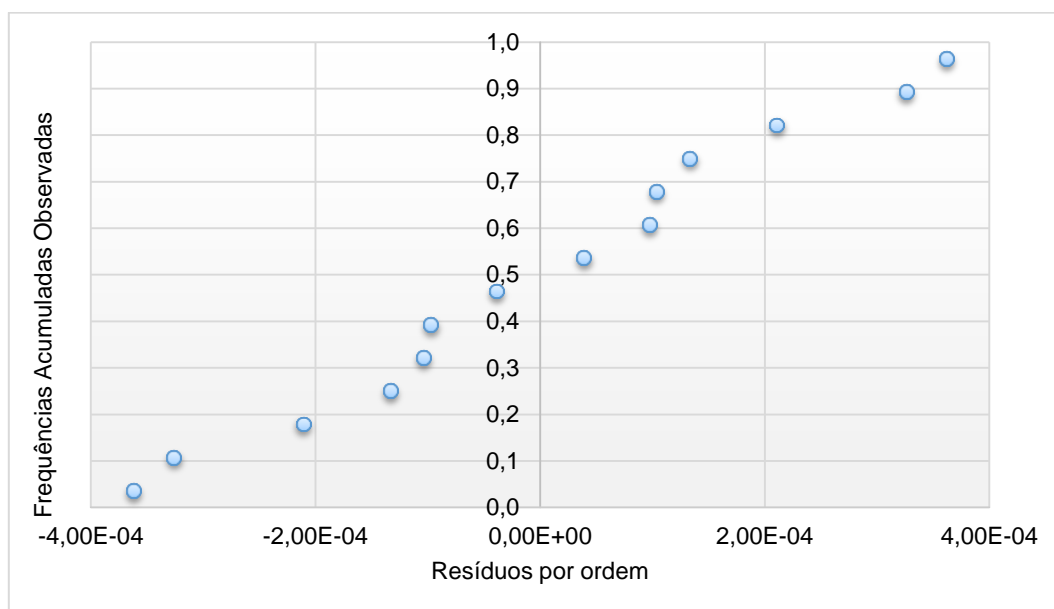


Figura 4.19 - Gráfico da normalidade dos resíduos do padrão BaA

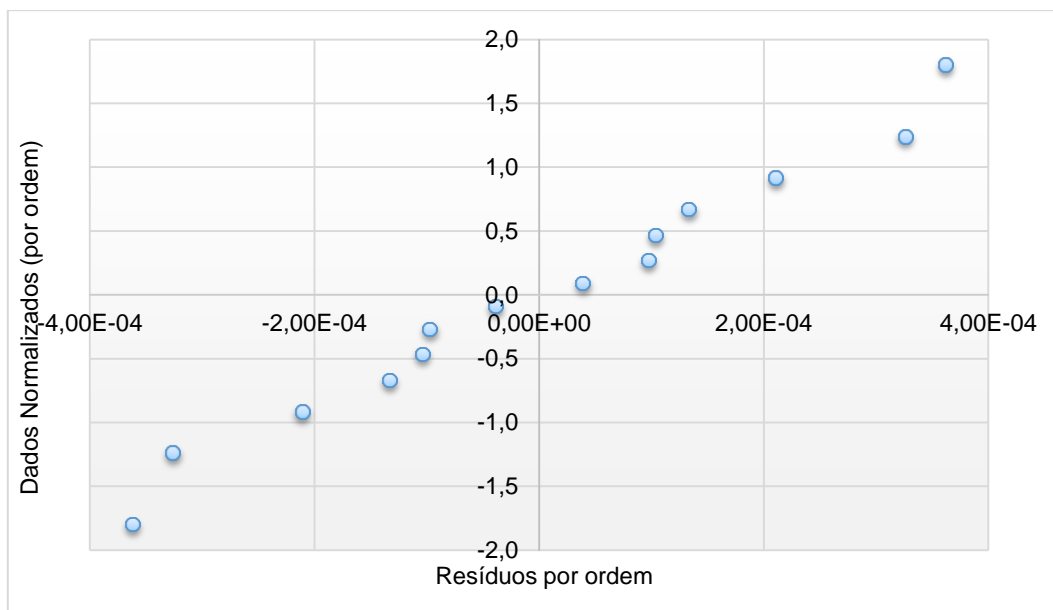


Figura 4.20 - Gráfico com dados normalizados, do padrão BaA, visualização de *outliers*

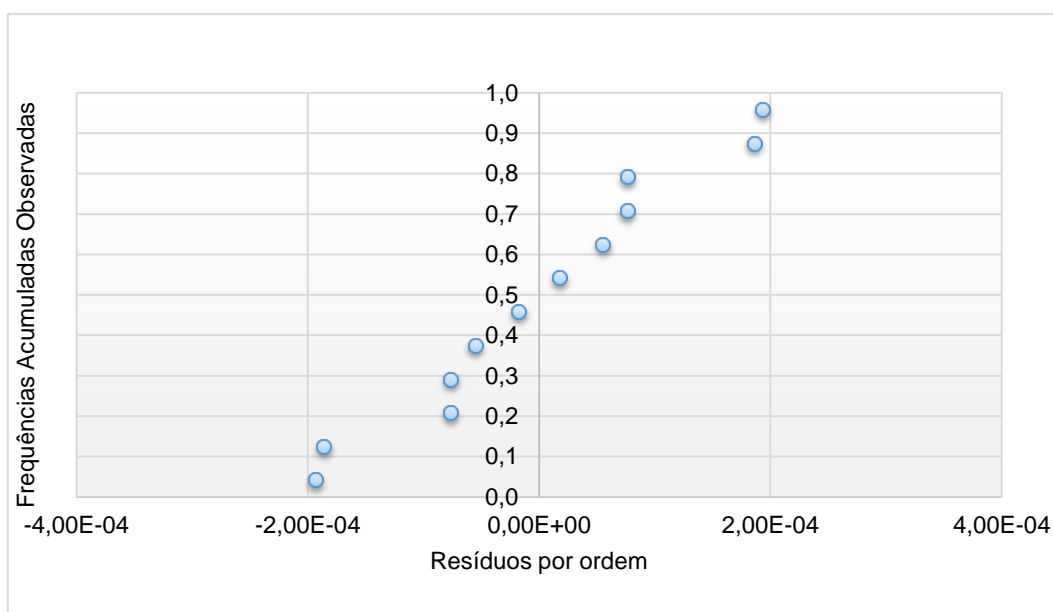


Figura 4.21 - Gráfico da normalidade dos resíduos do padrão CHR

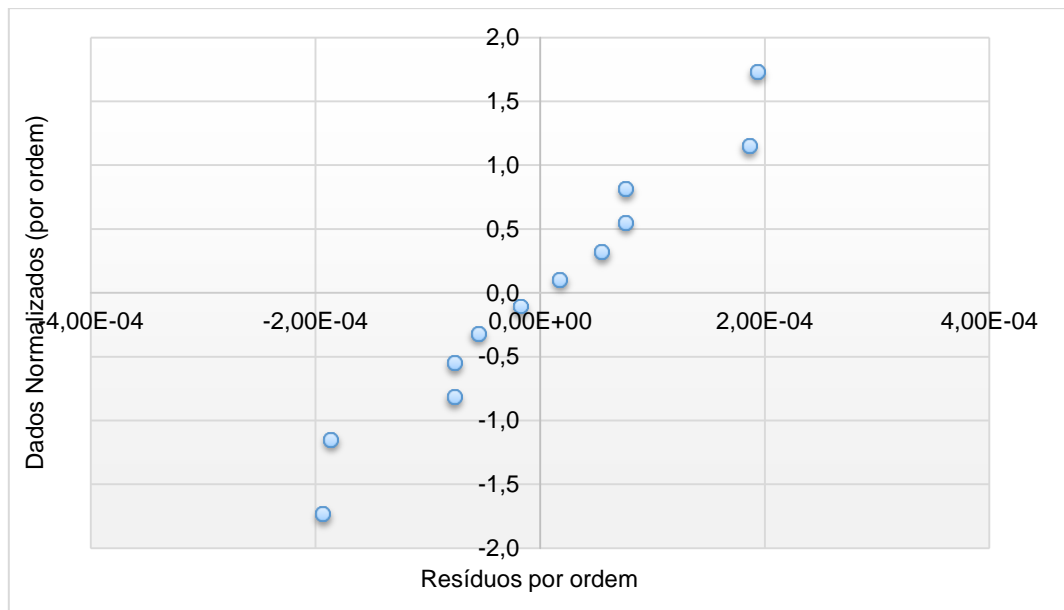


Figura 4.22 - Gráfico com dados normalizados, do padrão CHR, visualização de *outliers*

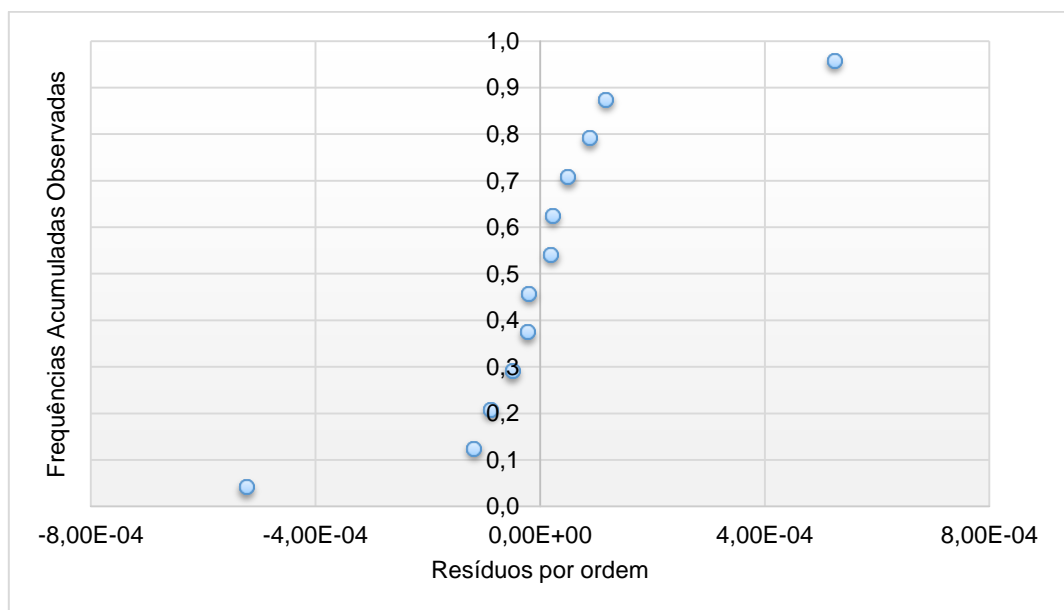


Figura 4.23 - Gráfico da normalidade dos resíduos do padrão BbF

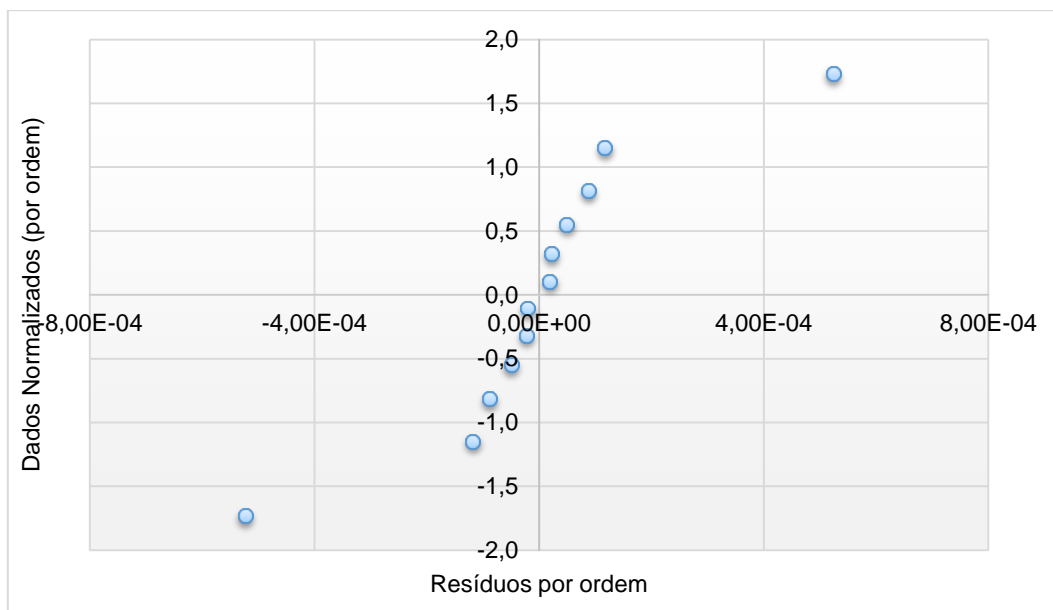


Figura 4.24 - Gráfico com dados normalizados, do padrão BbF, visualização de *outliers*

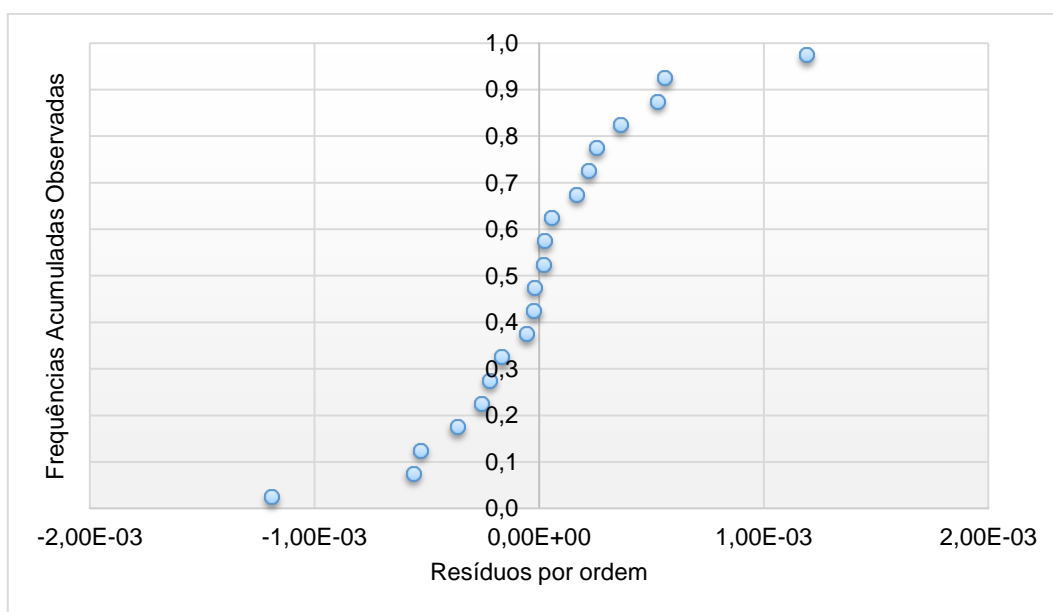


Figura 4.25 - Gráfico da normalidade dos resíduos do padrão BkF

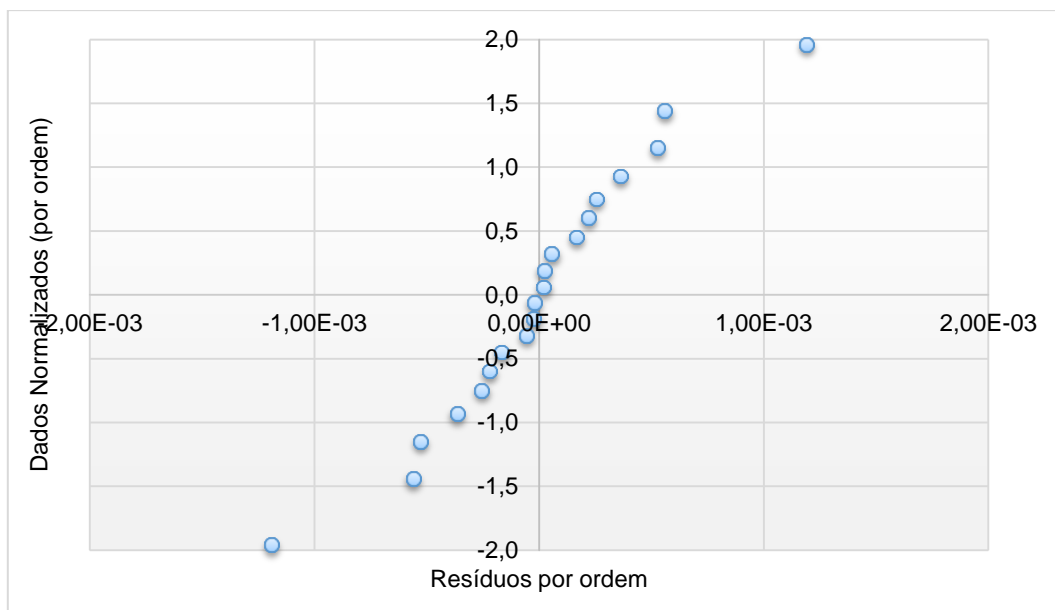


Figura 4.26 - Gráfico com dados normalizados, do padrão BkF, visualização de *outliers*

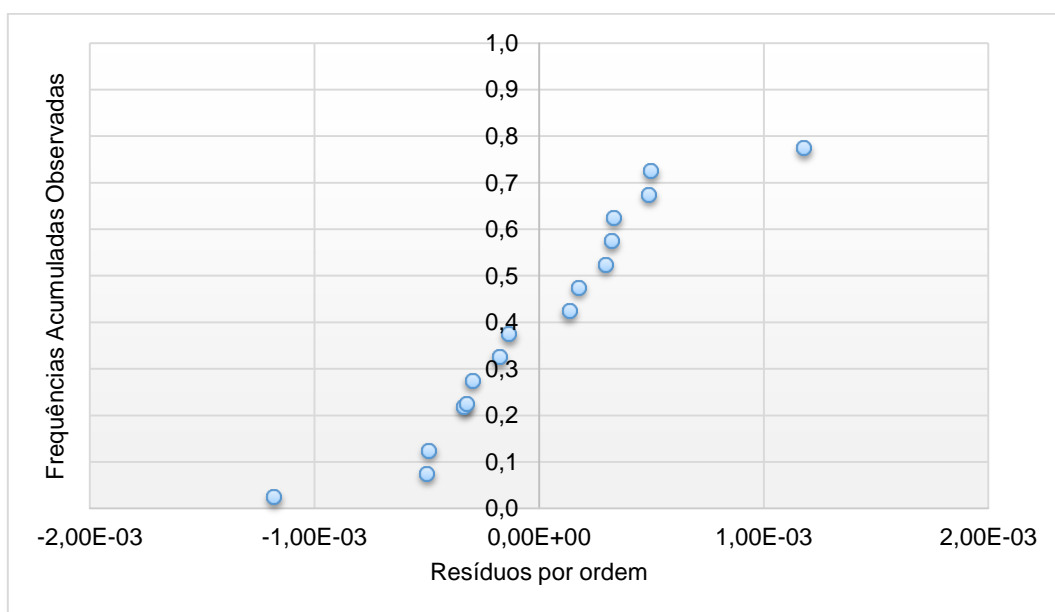


Figura 4.27 - Gráfico da normalidade dos resíduos do padrão BaP

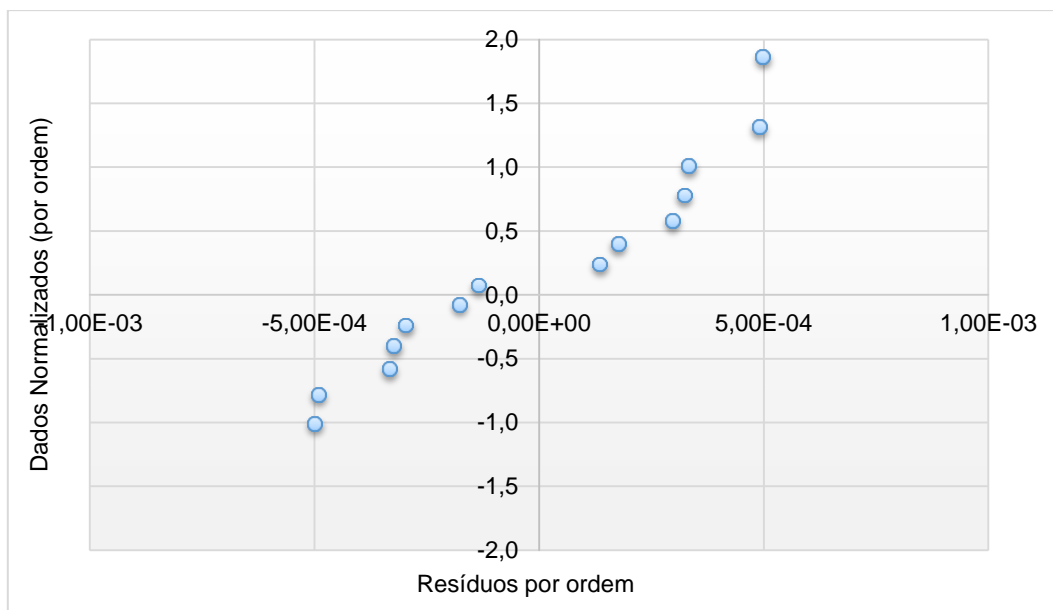


Figura 4.28 - Gráfico com dados normalizados, do padrão BaP, visualização de *outliers*

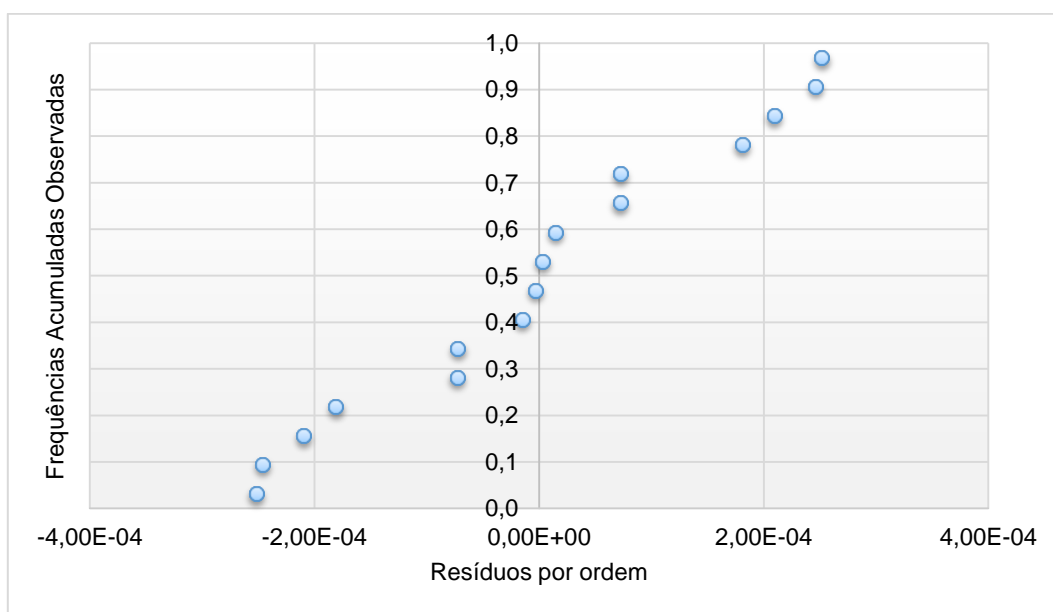


Figura 4.29 - Gráfico da normalidade dos resíduos do padrão Db(a,h)A

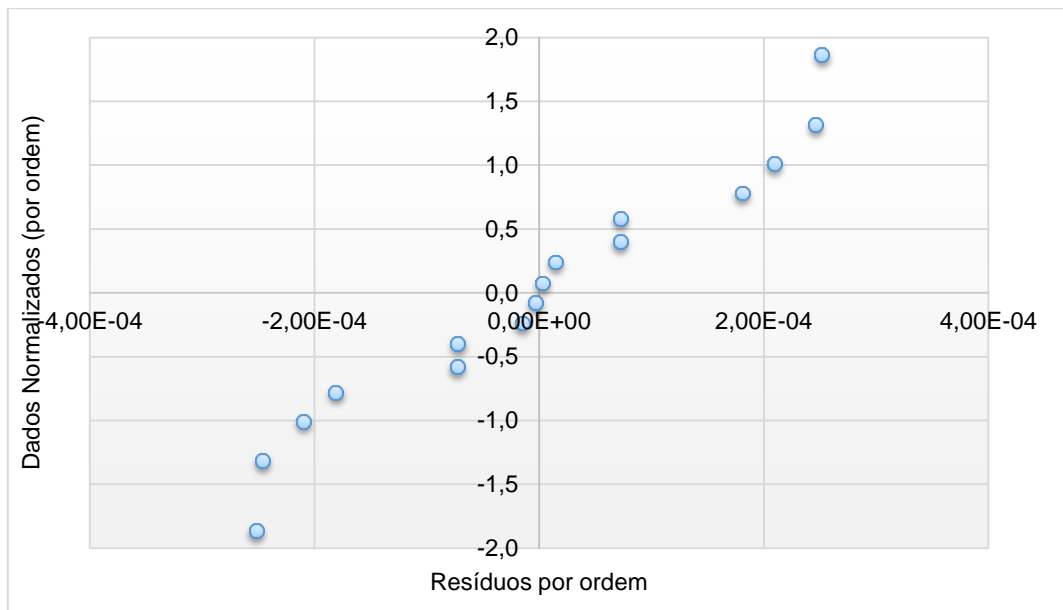


Figura 4.30 - Gráfico com dados normalizados, do padrão Db(a,h)A, visualização de *outliers*

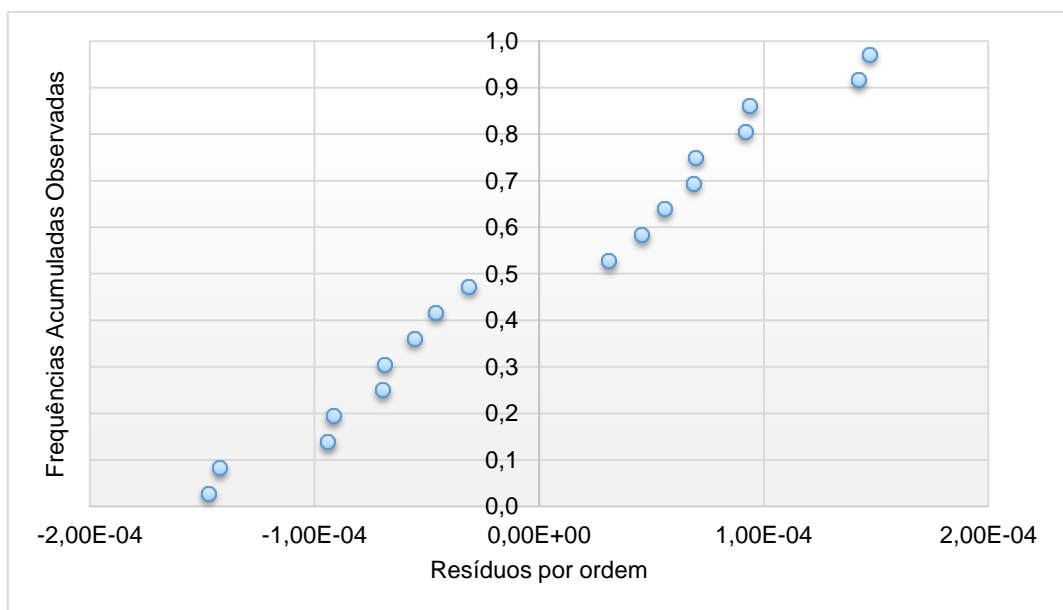


Figura 4.31 - Gráfico da normalidade dos resíduos do padrão B(g,h,i)P

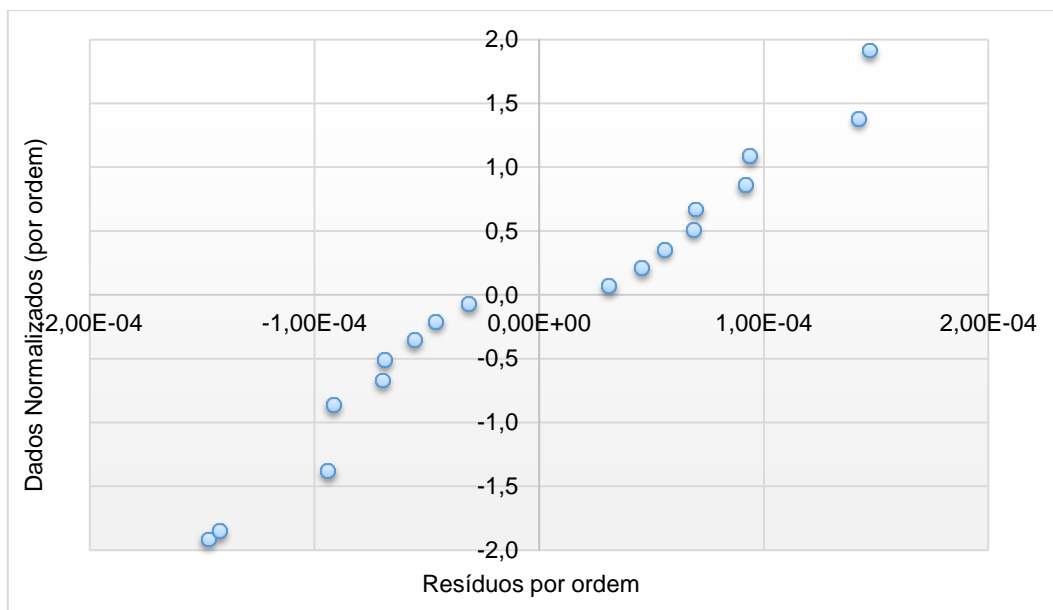


Figura 4.32 - Gráfico com dados normalizados, do padrão B(g,h,i)P, visualização de *outliers*

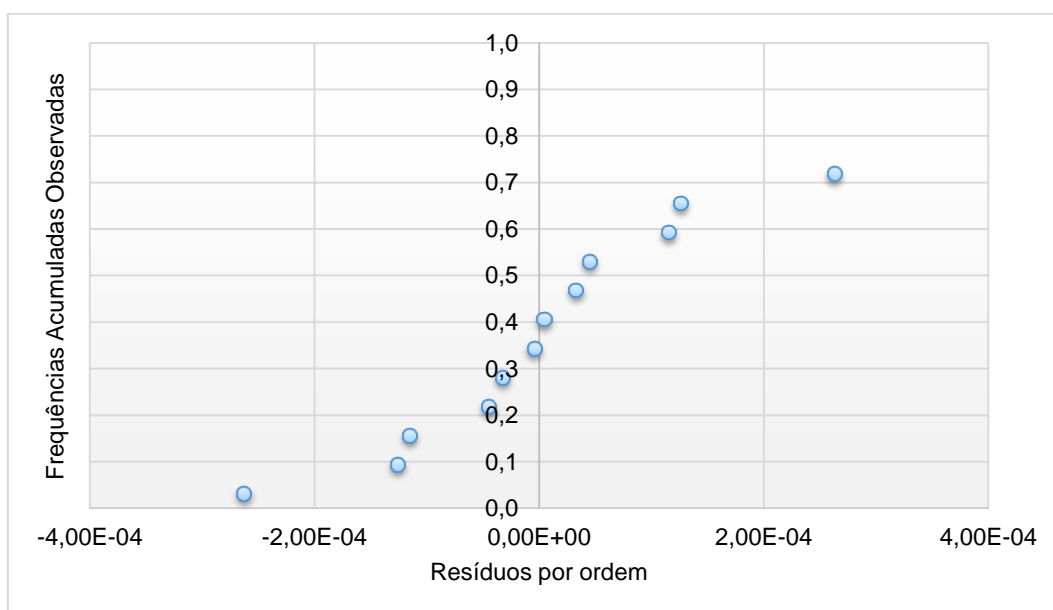


Figura 4.33 - Gráfico da normalidade dos resíduos do padrão I(1,2,3-cd)P

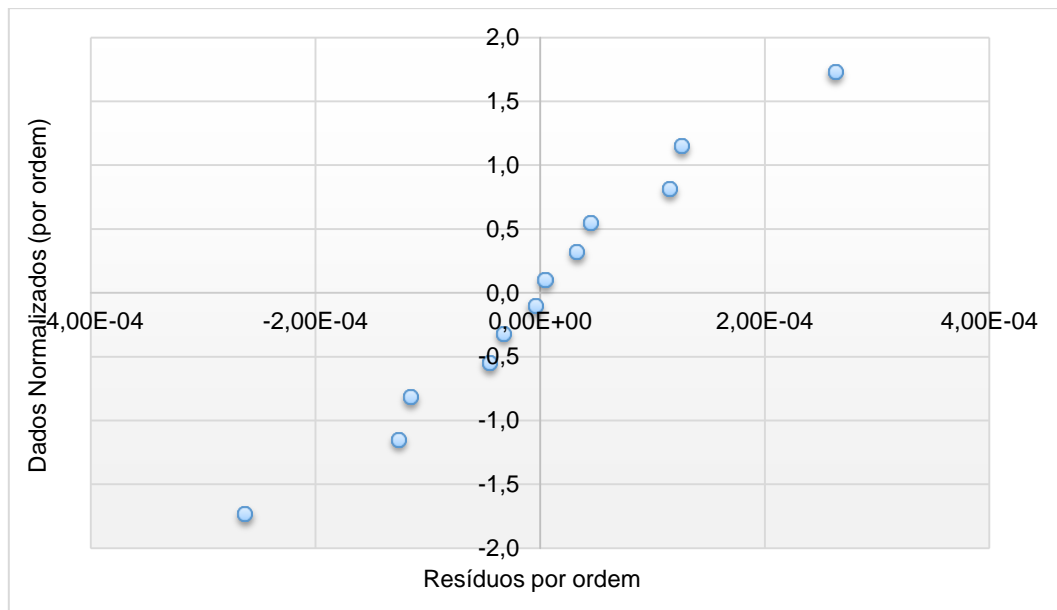


Figura 4.34 - Gráfico com dados normalizados, do padrão I(1,2,3-cd)P, visualização de *outliers*

Como se verifica, de uma forma prática, que os pontos se aproximam a uma reta, conclui-se que os resíduos de todos os padrões analisados apresentam normalidade.

Para uma avaliação mais objetiva da normalidade, realizaram-se os testes de Kolmogorov-Smirnov (KS) e do Qui-Quadrado (χ^2), para os quais são utilizadas as equações da secção 2.8.1.2 dos respetivos capítulos e obtiveram-se os resultados apresentados nas tabelas seguintes.

Nas tabelas do teste de Kolmogorov-Smirnov, a azul estarão representados os valores máximos de $|S(x)-F_0(x)|$, denominado D, sendo este posteriormente comparado ao valor de Dcrítico.

Tabela 4.11 - Teste de Kolmogorov – Smirnov para o padrão BaA

Teste de Kolmogorov Smirnov						
i	Resíduos por Ordem	S(x)	Z	F0(x)	S(x)-F0(x)	S(x)-F0(x)
1	-3,62E-04	0,071	-1,689	0,046	-0,046	0,046
					0,026	0,026
2	-3,26E-04	0,143	-1,522	0,064	0,007	0,007
					0,079	0,079
3	-2,11E-04	0,214	-0,985	0,162	-0,019	0,019
					0,052	0,052
4	-1,33E-04	0,286	-0,622	0,268	-0,053	0,053
					0,018	0,018
5	-1,04E-04	0,357	-0,484	0,316	-0,030	0,030
					0,042	0,042
6	-9,74E-05	0,429	-0,455	0,324	0,033	0,033
					0,105	0,105
7	-3,90E-05	0,500	-0,182	0,429	0,000	0,000
					0,071	0,071
8	3,90E-05	0,571	0,182	0,571	-0,071	0,071
					0,000	0,000
9	9,74E-05	0,643	0,455	0,676	-0,105	0,105
					-0,033	0,033
10	1,04E-04	0,714	0,484	0,684	-0,042	0,042
					0,030	0,030
11	1,33E-04	0,786	0,622	0,732	-0,018	0,018
					0,053	0,053
12	2,11E-04	0,857	0,985	0,838	-0,052	0,052
					0,019	0,019
13	3,26E-04	0,929	1,522	0,936	-0,079	0,079
					-0,007	0,007
14	3,62E-04	1,000	1,689	0,955	-0,026	0,026
					0,046	0,046

Tabela 4.12 - Teste do Qui-Quadrado para o padrão BaA

Teste do Qui-Quadrado					
intervalo k	Limites do intervalo	nº medidas observadas no intervalo k (Ok)	Limites do intervalo	nº medidas esperadas no intervalo k (Ek)	Desvios (Ok-Ek)
1	$e \leq -2,14E-04$	2	0,16	2,24	-0,24
2	$-2,14E-04 < e \leq -2,17E-19$	5	0,34	4,76	0,24
3	$-2,17E-19 < e \leq 2,14E-04$	5	0,34	4,76	0,24
4	$e > 2,14E-04$	2	0,16	2,24	-0,24

Tabela 4.13 - Teste de Kolmogorov – Smirnov para o padrão CHR

Teste de Kolmogorov Smirnov						
i	resíduos por ordem	S(x)	Z	F0(x)	S(x)-F0(x)	S(x)-F0(x)
1	-1,93E-04	0,083	-1,605	0,054	-0,054	0,054
					0,029	0,029
2	-1,86E-04	0,167	-1,546	0,050	0,033	0,033
					0,117	0,117
3	-7,65E-05	0,250	-0,635	0,263	-0,096	0,096
					-0,013	0,013
4	-7,62E-05	0,333	-0,633	0,264	-0,014	0,014
					0,069	0,069
5	-5,52E-05	0,417	-0,458	0,323	0,011	0,011
					0,094	0,094
6	-1,76E-05	0,500	-0,146	0,442	-0,025	0,025
					0,058	0,058
7	1,76E-05	0,583	0,146	0,558	-0,058	0,058
					0,025	0,025
8	5,52E-05	0,667	0,458	0,677	-0,094	0,094
					-0,011	0,011
9	7,62E-05	0,750	0,633	0,736	-0,069	0,069
					0,014	0,014
10	7,65E-05	0,833	0,635	0,738	0,013	0,013
					0,096	0,096
11	1,86E-04	0,917	1,546	0,950	-0,117	0,117
					-0,033	0,033
12	1,93E-04	1,000	1,605	0,946	-0,029	0,029
					0,054	0,054

Tabela 4.14 - Teste do Qui-Quadrado para o padrão CHR

Teste do Qui-Quadrado					
intervalo k	Limites do intervalo	nº medidas observadas no intervalo k (Ok)	Limites do intervalo	nº medidas esperadas no intervalo $k=N*\text{Prob}(Ek)$	Desvios (Ok-Ek)
1	$e \leq -1,20E-04$	2	0,16	1,92	0,08
2	$-1,20E-04 < e \leq -7,23E-20$	4	0,34	4,08	-0,08
3	$-7,23E-20 < e \leq 1,20E-04$	4	0,34	4,08	-0,08
4	$e > 1,20E-04$	2	0,16	1,92	0,08

Tabela 4.15 - Teste de Kolmogorov – Smirnov para o padrão BbF

Teste de Kolmogorov Smirnov						
i	Resíduos por Ordem	S(x)	Z	F0(x)	S(x)-F0(x)	S(x)-F0(x)
1	-5,24E-04	0,083	-2,345	0,010	-0,010	0,010
					0,074	0,074
2	-1,17E-04	0,167	-0,526	0,300	-0,217	0,217
					-0,133	0,133
3	-8,81E-05	0,250	-0,395	0,346	-0,179	0,179
					-0,096	0,096
4	-4,97E-05	0,333	-0,223	0,413	-0,163	0,163
					-0,080	0,080
5	-2,21E-05	0,417	-0,099	0,460	-0,127	0,127
					-0,044	0,044
6	-1,93E-05	0,500	-0,086	0,466	-0,049	0,049
					0,034	0,034
7	1,93E-05	0,583	0,086	0,534	-0,034	0,034
					0,049	0,049
8	2,21E-05	0,667	0,099	0,540	0,044	0,044
					0,127	0,127
9	4,97E-05	0,750	0,223	0,587	0,080	0,080
					0,163	0,163
10	8,81E-05	0,833	0,395	0,654	0,096	0,096
					0,179	0,179
11	1,17E-04	0,917	0,526	0,700	0,133	0,133
					0,217	0,217
12	5,24E-04	1,000	2,345	0,991	-0,074	0,074
					0,009	0,009

Tabela 4.16 - Teste do Qui-Quadrado para o padrão BbF

Teste do Qui-Quadrado					
intervalo k	Limites do intervalo	nº medidas observadas no intervalo k (Ok)	Limites do intervalo	nº medidas esperadas no intervalo k (Ek)	Desvios (Ok-Ek)
1	$e \leq -2,23E-04$	1	0,16	1,92	-0,92
2	$-2,23E-04 < e \leq -6,51E-19$	5	0,34	4,08	0,92
3	$-6,51E-19 < e \leq 2,23E-04$	5	0,34	4,08	0,92
4	$e > 2,23E-04$	1	0,16	1,92	-0,92

Tabela 4.17 - Teste de Kolmogorov – Smirnov para o padrão BkF

Teste de Kolmogorov Smirnov						
i	Resíduos por Ordem	S(x)	Z	F0(x)	S(x)-F0(x)	S(x)-F0(x)
1	-1,19E-03	0,050	-2,490	0,006	-0,006	0,006
					0,044	0,044
2	-5,60E-04	0,100	-1,170	0,121	-0,071	0,071
					-0,021	0,021
3	-5,28E-04	0,150	-1,104	0,136	-0,036	0,036
					0,014	0,014
4	-3,63E-04	0,200	-0,759	0,224	-0,074	0,074
					-0,024	0,024
5	-2,55E-04	0,250	-0,533	0,298	-0,098	0,098
					-0,048	0,048
6	-2,21E-04	0,300	-0,461	0,323	-0,073	0,073
					-0,023	0,023
7	-1,66E-04	0,350	-0,348	0,363	-0,063	0,063
					-0,013	0,013
8	-5,62E-05	0,400	-0,118	0,452	-0,102	0,102
					-0,052	0,052
9	-2,37E-05	0,450	-0,050	0,480	-0,080	0,080
					-0,030	0,030
10	-2,14E-05	0,500	-0,045	0,482	-0,032	0,032
					0,018	0,018
11	2,14E-05	0,550	0,045	0,518	-0,018	0,018
					0,032	0,032
12	2,37E-05	0,600	0,050	0,520	0,030	0,030
					0,080	0,080
13	5,62E-05	0,650	0,118	0,548	0,052	0,052
					0,102	0,102
14	1,66E-04	0,700	0,348	0,637	0,013	0,013
					0,063	0,063
15	2,21E-04	0,750	0,461	0,677	0,023	0,023
					0,073	0,073
16	2,55E-04	0,800	0,533	0,702	0,048	0,048
					0,098	0,098
17	3,63E-04	0,850	0,759	0,776	0,024	0,024
					0,074	0,074
18	5,28E-04	0,900	1,104	0,864	-0,014	0,014
					0,036	0,036
19	5,60E-04	0,950	1,170	0,879	0,021	0,021
					0,071	0,071
20	1,19E-03	1,000	2,490	0,994	-0,044	0,044
					0,006	0,006

Tabela 4.18 -Teste do Qui-Quadrado para o padrão BkF

Teste do Qui-Quadrado					
intervalo k	Limites do intervalo	nº medidas observadas no intervalo k (Ok)	Limites do intervalo	nº medidas esperadas no intervalo k (Ek)	Desvios (Ok-Ek)
1	$e \leq -4,78E-04$	3	0,16	3,2	-0,2
2	$-4,78E-04 < e \leq 4,08E-18$	7	0,34	6,8	0,2
3	$4,08E-18 < e \leq 4,78E-04$	7	0,34	6,8	0,2
4	$e > 4,78E-04$	3	0,16	3,2	-0,2

Tabela 4.19 - Teste de Kolmogorov – Smirnov para o padrão BaP

Teste de Kolmogorov Smirnov						
i	Resíduos por Ordem	S(x)	Z	F0(x)	S(x)-F0(x)	S(x)-F0(x)
1	-1,18E-03	0,063	-2,233	0,013	-0,013	0,013
					0,050	0,050
2	-4,99E-04	0,125	-0,944	0,174	-0,111	0,111
					-0,049	0,049
3	-4,90E-04	0,188	-0,928	0,176	-0,051	0,051
					0,011	0,011
4	-3,33E-04	0,250	-0,630	0,264	-0,077	0,077
					-0,014	0,014
5	-3,23E-04	0,313	-0,611	0,271	-0,021	0,021
					0,042	0,042
6	-2,97E-04	0,375	-0,561	0,288	0,025	0,025
					0,087	0,087
7	-1,77E-04	0,438	-0,334	0,371	0,004	0,004
					0,067	0,067
8	-1,35E-04	0,500	-0,255	0,400	0,038	0,038
					0,100	0,100
9	1,35E-04	0,563	0,255	0,600	-0,100	0,100
					-0,038	0,038
10	1,77E-04	0,625	0,334	0,629	-0,067	0,067
					-0,004	0,004
11	2,97E-04	0,688	0,561	0,712	-0,087	0,087
					-0,025	0,025
12	3,23E-04	0,750	0,611	0,729	-0,042	0,042
					0,021	0,021
13	3,33E-04	0,813	0,630	0,736	0,014	0,014
					0,077	0,077
14	4,90E-04	0,875	0,928	0,824	-0,011	0,011
					0,051	0,051
15	4,99E-04	0,938	0,944	0,826	0,049	0,049
					0,111	0,111
16	1,18E-03	1,000	2,233	0,987	-0,050	0,050
					0,013	0,013

Tabela 4.20 - Teste do Qui-Quadrado para o padrão BaP

Teste do Qui-Quadrado					
intervalo k	Limites do intervalo	nº medidas observadas no intervalo k (Ok)	Limites do intervalo	nº medidas esperadas no intervalo k (Ek)	Desvios (Ok-Ek)
1	$e \leq -5,28E-04$	1	0,16	2,56	-1,56
2	$-5,28E-04 < e \leq -1,52E-18$	7	0,34	5,44	1,56
3	$-1,52E-18 < e \leq 5,28E-04$	7	0,34	5,44	1,56
4	$e > 5,28E-04$	1	0,16	2,56	-1,56

Tabela 4.21 - Teste de Kolmogorov – Smirnov para o padrão Db(a,h)A

Teste de Kolmogorov Smirnov						
i	Resíduos por Ordem	S(x)	Z	F0(x)	S(x)-F0(x)	S(x)-F0(x)
1	-2,52E-04	0,063	-1,550	0,061	-0,061	0,061
					0,002	0,002
2	-2,46E-04	0,125	-1,515	0,030	0,032	0,032
					0,095	0,095
3	-2,09E-04	0,188	-1,289	0,099	0,027	0,027
					0,089	0,089
4	-1,81E-04	0,250	-1,112	0,134	0,054	0,054
					0,117	0,117
5	-7,27E-05	0,313	-0,447	0,326	-0,076	0,076
					-0,014	0,014
6	-7,23E-05	0,375	-0,445	0,339	-0,026	0,026
					0,037	0,037
7	-1,48E-05	0,438	-0,091	0,464	-0,089	0,089
					-0,027	0,027
8	-3,17E-06	0,500	-0,019	0,492	-0,055	0,055
					0,008	0,008
9	3,17E-06	0,563	0,019	0,508	-0,008	0,008
					0,055	0,055
10	1,48E-05	0,625	0,091	0,536	0,027	0,027
					0,089	0,089
11	7,23E-05	0,688	0,445	0,662	-0,037	0,037
					0,026	0,026
12	7,27E-05	0,750	0,447	0,674	0,014	0,014
					0,076	0,076
13	1,81E-04	0,813	1,112	0,867	-0,117	0,117
					-0,054	0,054
14	2,09E-04	0,875	1,289	0,902	-0,089	0,089
					-0,027	0,027
15	2,46E-04	0,938	1,515	0,970	-0,095	0,095
					-0,032	0,032
16	2,52E-04	1,000	1,550	0,939	-0,002	0,002
					0,061	0,061

Tabela 4.22 - Teste do Qui-Quadrado para o padrão Db(a,h)A

Teste do Qui-Quadrado					
intervalo k	Limites do intervalo	nº medidas observadas no intervalo k (Ok)	Limites do intervalo	nº medidas esperadas no intervalo k (Ek)	Desvios (Ok-Ek)
1	$e \leq -1,63E-04$	4	0,16	2,56	1,44
2	$-1,63E-04 < e \leq 1,00E-18$	4	0,34	5,44	-1,44
3	$1,00E-18 < e \leq 1,63E-04$	4	0,34	5,44	-1,44
4	$e > 1,63E-04$	4	0,16	2,56	1,44

Tabela 4.23 - Teste de Kolmogorov – Smirnov para o padrão B(g,h,i)P

Teste de Kolmogorov Smirnov						
i	Resíduos por Ordem	S(x)	Z	F0(x)	S(x)-F0(x)	S(x)-F0(x)
1	-1,47E-04	0,056	-1,614	0,054	-0,054	0,054
					0,002	0,002
2	-1,42E-04	0,111	-1,559	0,049	0,007	0,007
					0,063	0,063
3	-9,39E-05	0,167	-1,029	0,152	-0,040	0,040
					0,015	0,015
4	-9,17E-05	0,222	-1,005	0,157	0,010	0,010
					0,065	0,065
5	-6,98E-05	0,278	-0,765	0,222	0,001	0,001
					0,056	0,056
6	-6,88E-05	0,333	-0,754	0,230	0,048	0,048
					0,104	0,104
7	-5,57E-05	0,389	-0,610	0,271	0,062	0,062
					0,118	0,118
8	-4,59E-05	0,444	-0,503	0,309	0,080	0,080
					0,136	0,136
9	-3,12E-05	0,500	-0,342	0,367	0,078	0,078
					0,133	0,133
10	3,12E-05	0,556	0,342	0,633	-0,133	0,133
					-0,078	0,078
11	4,59E-05	0,611	0,503	0,692	-0,136	0,136
					-0,080	0,080
12	5,57E-05	0,667	0,610	0,729	-0,118	0,118
					-0,062	0,062
13	6,88E-05	0,722	0,754	0,770	-0,104	0,104
					-0,048	0,048
14	6,98E-05	0,778	0,765	0,779	-0,056	0,056
					-0,001	0,001
15	9,17E-05	0,833	1,005	0,843	-0,065	0,065
					-0,010	0,010
16	9,39E-05	0,889	1,029	0,849	-0,015	0,015
					0,040	0,040
17	1,42E-04	0,944	1,559	0,952	-0,063	0,063
					-0,007	0,007
18	1,47E-04	1,000	1,614	0,946	-0,002	0,002
					0,054	0,054

Tabela 4.24 - Teste do Qui-Quadrado para o padrão B(g,h,i)P

Teste do Qui-Quadrado					
intervalo k	Limites do intervalo	nº medidas observadas no intervalo k (Ok)	Limites do intervalo	nº medidas esperadas no intervalo k (Ek)	Desvios (Ok-Ek)
1	$e \leq -9,12E-05$	4	0,16	2,88	1,12
2	$-9,12E-05 < e \leq 8,43E-19$	5	0,34	6,12	-1,12
3	$8,43E-19 < e \leq 9,12E-05$	5	0,34	6,12	-1,12
4	$e > 9,12E-05$	4	0,16	2,88	1,12

Tabela 4.25 - Teste de Kolmogorov – Smirnov para o padrão I(1,2,3-cd)P

Teste de Kolmogorov Smirnov						
i	Resíduos por Ordem	S(x)	Z	F0(x)	S(x)-F0(x)	S(x)-F0(x)
1	-2,63E-04	0,083	-2,022	0,022	-0,022	0,022
					0,062	0,062
2	-1,26E-04	0,167	-0,969	0,166	-0,083	0,083
					0,001	0,001
3	-1,15E-04	0,250	-0,887	0,187	-0,020	0,020
					0,063	0,063
4	-4,49E-05	0,333	-0,345	0,365	-0,115	0,115
					-0,032	0,032
5	-3,27E-05	0,417	-0,251	0,401	-0,068	0,068
					0,015	0,015
6	-4,39E-06	0,500	-0,034	0,487	-0,070	0,070
					0,013	0,013
7	4,39E-06	0,583	0,034	0,513	-0,013	0,013
					0,070	0,070
8	3,27E-05	0,667	0,251	0,599	-0,015	0,015
					0,068	0,068
9	4,49E-05	0,750	0,345	0,635	0,032	0,032
					0,115	0,115
10	1,15E-04	0,833	0,887	0,813	-0,063	0,063
					0,020	0,020
11	1,26E-04	0,917	0,969	0,834	-0,001	0,001
					0,083	0,083
12	2,63E-04	1,000	2,022	0,978	-0,062	0,062
					0,022	0,022

Tabela 4.26 - Teste do Qui-Quadrado para o padrão I(1,2,3-cd)P

Teste do Qui-Quadrado					
intervalo k	Limites do intervalo	nº medidas observadas no intervalo k (Ok)	Limites do intervalo	nº medidas esperadas no intervalo k (Ek)	Desvios (Ok-Ek)
1	$e \leq -1,30E-04$	1	0,16	1,92	-0,92
2	$-1,30E-04 < e \leq -1,81E-19$	5	0,34	4,08	0,92
3	$-1,81E-19 < e \leq 1,30E-04$	5	0,34	4,08	0,92
4	$e > 1,30E-04$	1	0,16	1,92	-0,92

Para uma mais fácil visualização dos resultados dos dois testes, estes são apresentados numa tabela resumo (tabela 4.27 e 4.28) e discutidos os resultados.

Tabela 4.27 - Tabela resumo dos valores de D e Dcrítico para o teste de Kolmogorov-Smirnov

Composto	D	Dcrítico
BaA	0,105	0,227
CHR	0,117	0,242
BbF	0,217	0,242
BkF	0,102	0,190
BaP	0,111	0,213
Db(a,h)A	0,117	0,213
B(g,h,i)P	0,136	0,200
I(1,2,3-cd)P	0,115	0,242

Para $\alpha = 0,05$, como $D < D_{\text{crítico}}$, para todos os compostos, os dados revelam pertencer a uma distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Tabela 4.28 - Tabela resumo dos valores de χ^2 para o teste do Qui-Quadrado

Composto	Nº de intervalos	χ^2
BaA	4	0,08
CHR		0,01
BbF		1,30
BkF		0,04
BaP		2,80
Db(a,h)A		2,38
B(g,h,i)P		1,28
I(1,2,3-cd)P		1,30

Como χ^2 é menor que o nº de intervalos, para todos os compostos, os dados revelam pertencer a uma distribuição normal.

b. Independência dos Resíduos

Este parâmetro foi avaliado através da construção de um gráfico de resíduos *versus* ordem de experiências que permite visualizar a independência dos resíduos, como se verifica de seguida.

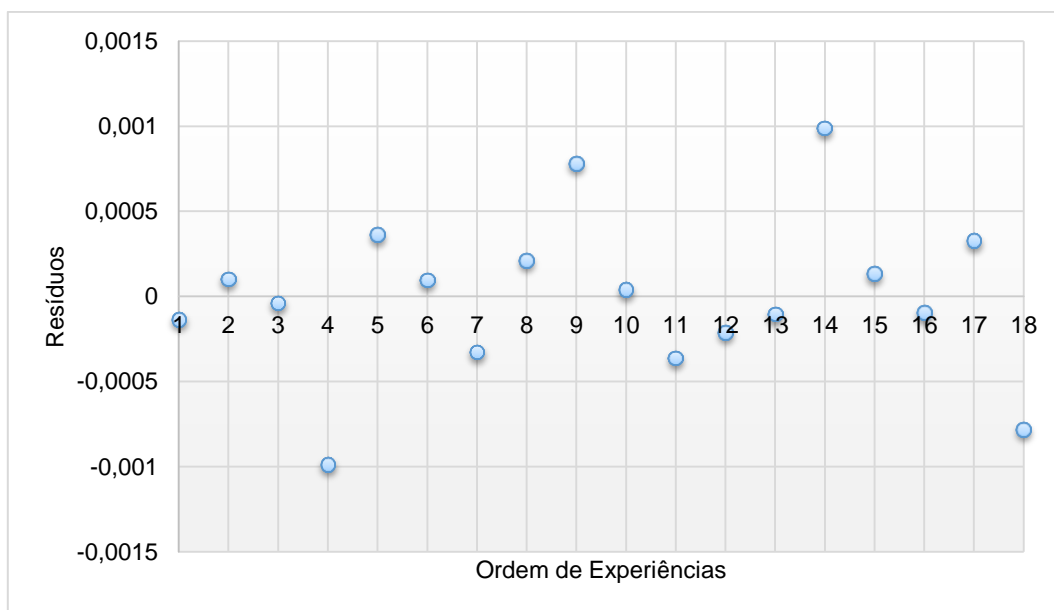


Figura 4.35 - Gráfico da Independência dos Resíduos para o padrão BaA

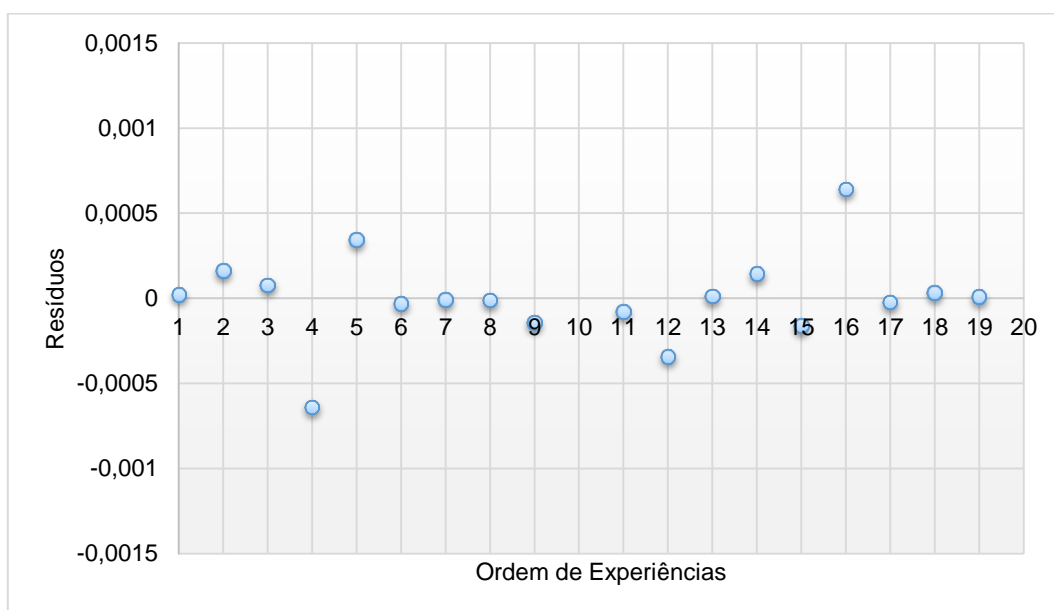


Figura 4.36 - Gráfico da Independência dos Resíduos para o padrão CHR

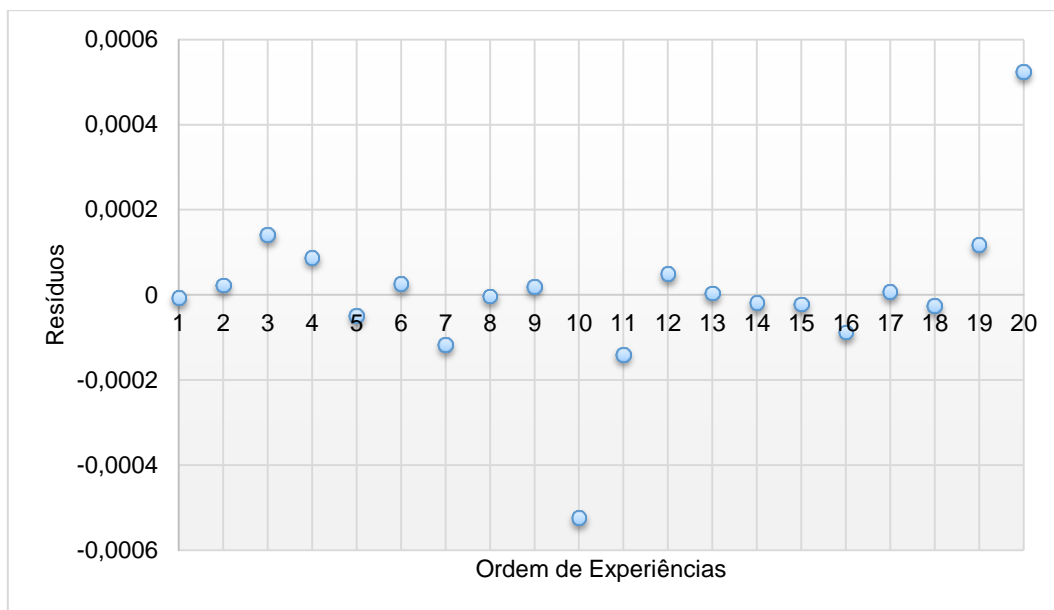


Figura 4.37 - Gráfico da Independência dos Resíduos para o padrão BbF

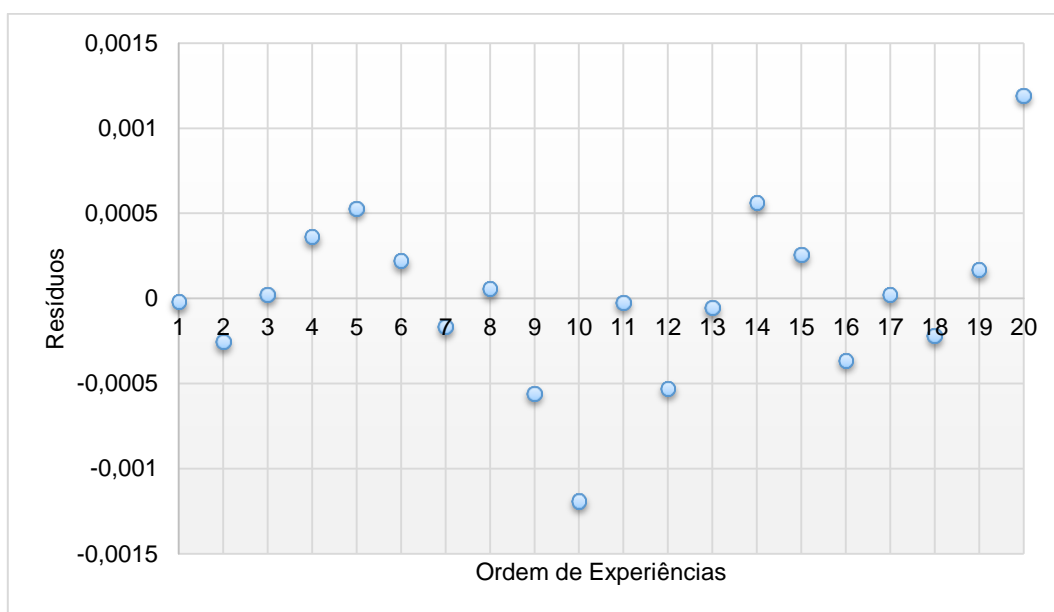


Figura 4.38 - Gráfico da Independência dos Resíduos para o padrão BkF

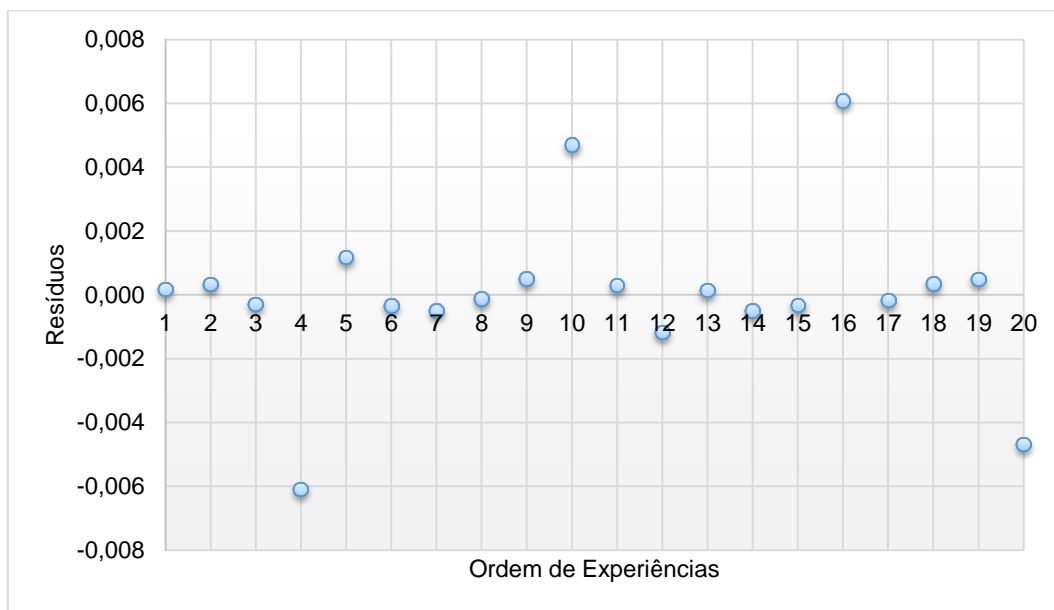


Figura 4.39 - Gráfico da Independência dos Resíduos para o padrão BaP

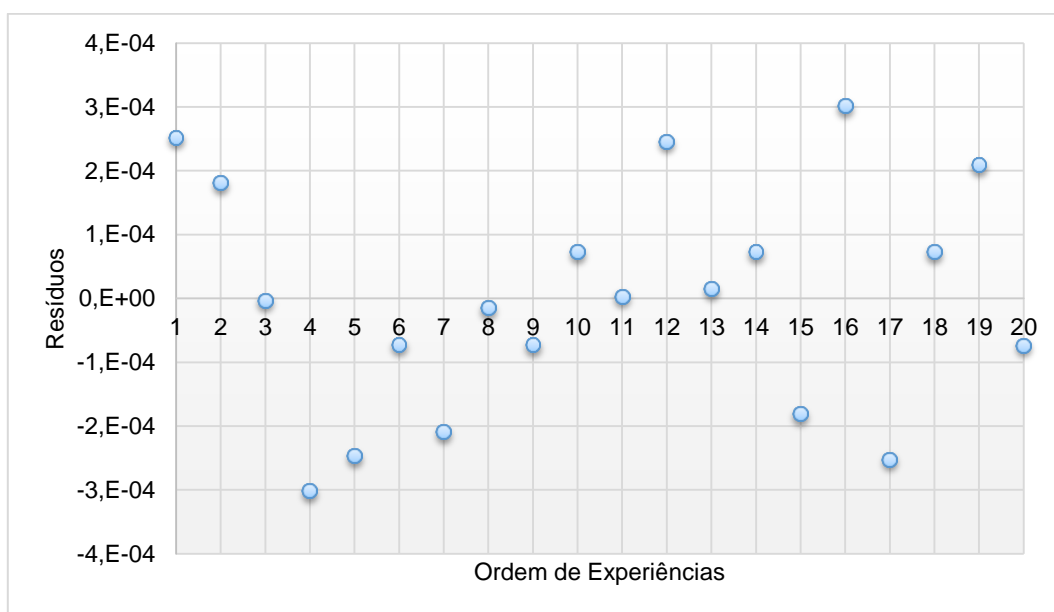


Figura 4.40 - Gráfico da Independência dos Resíduos para o padrão Db(a,h)A

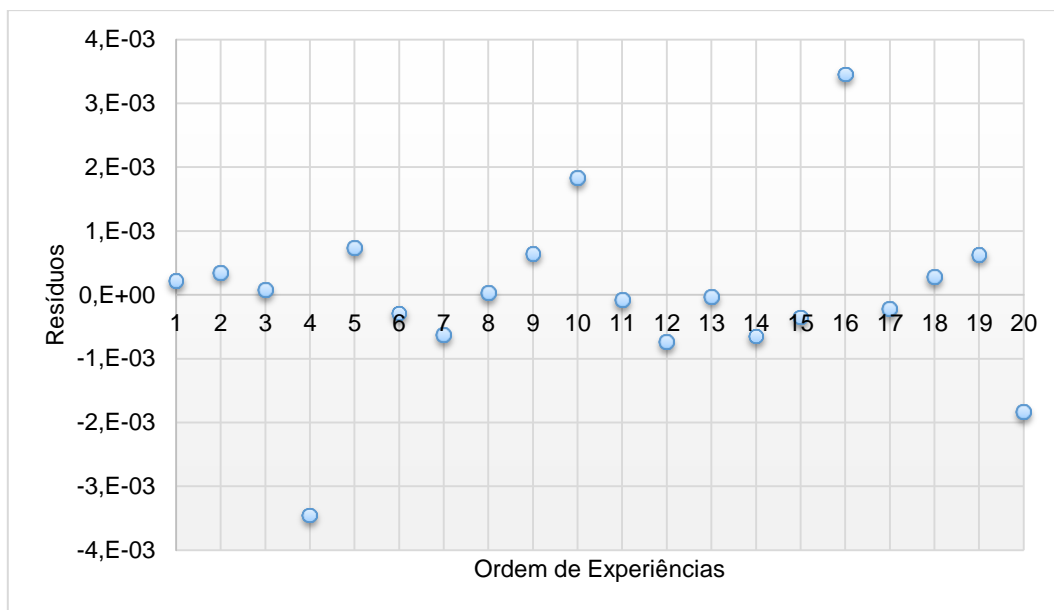


Figura 4.41 - Gráfico da Independência dos Resíduos para o padrão B(g,h,i)P

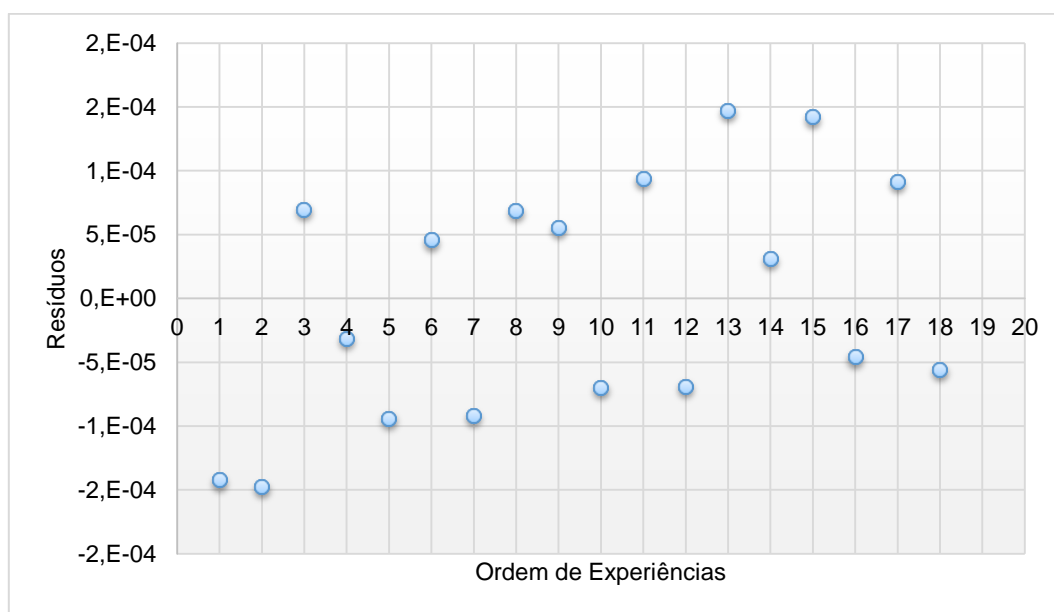


Figura 4.42 - Gráfico da Independência dos Resíduos para o padrão I(1,2,3-cd)P

Verifica-se que os resíduos se dispõem nos gráficos de forma aleatória, sem demonstrarem qualquer tendência especial, de modo que se assume que a hipótese de independência dos resíduos é satisfeita para os 8 PAH's.

c. Homogeneidade da variância

Este ponto foi analisado através do teste de Cochran.

Tabela 4.29 - Teste de Cochran para o padrão BaA

Teste de Cochran				
Concentração	Resíduos		\bar{y}_i	s^2
2	3,62E-04	-3,62E-04	0,00	2,62E-07
1	2,11E-04	-2,11E-04	8,67E-19	8,90E-08
0,75	1,04E-04	-1,04E-04	8,67E-19	2,15E-08
0,5	3,26E-04	-3,26E-04	4,34E-19	2,13E-07
0,4	3,90E-05	-3,90E-05	-4,34E-19	3,04E-09
0,3	-9,74E-05	9,74E-05	0,00	1,90E-08
0,2	-1,33E-04	1,33E-04	-2,17E-19	3,55E-08
			Soma s^2	6,43E-07
			Máx s^2	2,62E-07

Tabela 4.30 - Teste de Cochran para o padrão CHR

Teste de Cochran				
Concentração	Resíduos		\bar{y}_i	s^2
2	-7,65E-05	7,65E-05	-1,73E-18	1,17E-08
1	-1,86E-04	1,86E-04	8,67E-19	6,94E-08
0,75	-7,62E-05	7,62E-05	0,00	1,16E-08
0,5	-1,93E-04	1,93E-04	4,34E-19	7,48E-08
0,4	-1,76E-05	1,76E-05	0,00	6,22E-10
0,3	-5,52E-05	5,52E-05	0,00	6,09E-09
			Soma s^2	1,74E-07
			Máx s^2	7,48E-08

Tabela 4.31 - Teste de Cochran para o padrão BbF

Teste de Cochran				
Concentração	Resíduos		\bar{y}_i	s^2
10	-5,24E-04	5,24E-04	0,00	5,48E-07
5	-8,81E-05	8,81E-05	-3,47E-18	1,55E-08
2	-4,97E-05	4,97E-05	0,00	4,94E-09
1	1,93E-05	-1,93E-05	0,00	7,42E-10
0,75	2,21E-05	-2,21E-05	-4,34E-19	9,78E-10
0,5	1,17E-04	-1,17E-04	0,00	2,75E-08
			Soma s^2	5,98E-07
			Máx s^2	5,48E-07

Tabela 4.32 - Teste de Cochran para o padrão BkF

Teste de Cochran				
Concentração	Resíduos		\bar{y}_i	s^2
10	-1,19E-03	1,19E-03	5,55E-17	2,84E-06
5	-3,63E-04	3,63E-04	0,00	2,64E-07
2	5,28E-04	-5,28E-04	-1,39E-17	5,58E-07
1	-5,60E-04	5,60E-04	0,00	6,27E-07
0,75	-2,55E-04	2,55E-04	-3,47E-18	1,30E-07
0,5	1,66E-04	-1,66E-04	3,47E-18	5,53E-08
0,4	-2,37E-05	2,37E-05	-3,47E-18	1,12E-09
0,3	-2,21E-04	2,21E-04	1,73E-18	9,73E-08
0,2	-2,14E-05	2,14E-05	1,73E-18	9,17E-10
0,1	5,62E-05	-5,62E-05	-8,67E-19	6,33E-09
			Soma s^2	4,58E-06
			Máx s^2	2,84E-06

Tabela 4.33 - Teste de Cochran para o padrão BaP

Teste de Cochran				
Concentração	Resíduos		\bar{y}_i	s^2
2	1,18E-03	-1,18E-03	-6,94E-18	2,78E-06
1	4,99E-04	-4,99E-04	0,00	4,98E-07
0,75	3,23E-04	-3,23E-04	-3,47E-18	2,09E-07
0,5	4,90E-04	-4,90E-04	0,00	4,80E-07
0,4	2,97E-04	-2,97E-04	0,00	1,76E-07
0,3	3,33E-04	-3,33E-04	-8,67E-19	2,22E-07
			Soma s^2	4,37E-06
			Máx s^2	2,78E-06

Tabela 4.34 - Teste de Cochran para o padrão Db(a,h)A

Teste de Cochran				
Concentração	Resíduos		\bar{y}_i	s^2
2	-2,46E-04	2,46E-04	6,94E-18	1,21E-07
1	-7,27E-05	7,27E-05	0,00	1,06E-08
0,75	1,81E-04	-1,81E-04	0,00	6,54E-08
0,5	2,09E-04	-2,09E-04	1,73E-18	8,77E-08
0,4	3,17E-06	-3,17E-06	-8,67E-19	2,01E-11
0,3	7,23E-05	-7,23E-05	0,00	1,05E-08
0,2	2,52E-04	-2,52E-04	0,00	1,27E-07
0,1	-1,48E-05	1,48E-05	2,17E-19	4,37E-10
			Soma s^2	4,23E-07
			Máx s^2	1,27E-07

Tabela 4.35 - Teste de Cochran para o padrão B(g,h,i)P

Teste de Cochran				
Concentração	Resíduos		\bar{y}_i	s^2
10	5,57E-05	-3,12E-05	0,00	3,77E-09
5	3,12E-05	9,39E-05	0,00	1,96E-09
2	-9,39E-05	-6,88E-05	0,00	3,15E-10
1	6,88E-05	1,47E-04	1,08E-04	3,08E-09
0,75	-1,47E-04	-9,17E-05	-1,19E-04	1,54E-09
0,5	9,17E-05	6,98E-05	8,08E-05	2,41E-10
0,4	-6,98E-05	4,59E-05	0,00	6,69E-09
0,3	-4,59E-05	1,42E-04	0,00	1,77E-08
0,2	-1,42E-04	0,00E+00	0,00	1,01E-08
			Soma s^2	4,54E-08
			Máx s^2	1,77E-08

Tabela 4.36 - Teste de Cochran para o padrão I(1,2,3-cd)P

Teste de Cochran				
Concentração	Resíduos		\bar{y}_i	s^2
10	2,63E-04	-2,63E-04	0,00	1,38E-07
7	4,49E-05	-4,49E-05	0,00	4,03E-09
5	-1,15E-04	1,15E-04	0,00	2,66E-08
2	1,26E-04	-1,26E-04	0,00	3,17E-08
1	4,39E-06	-4,39E-06	-1,08E-19	3,85E-11
0,9	-3,27E-05	3,27E-05	-1,08E-19	2,13E-09
Soma s^2				2,03E-07
Máx s^2				1,38E-07

Tal como para os testes anteriores, também vai ser apresentada a tabela resumo 4.37 para facilitar a visualização de resultados.

Tabela 4.37 - Tabela resumo dos valores de C e Ccrítico para o teste de Cochran

Composto	C	Ccrítico
BaA	0,4077	0,7271
CHR	0,4293	0,7808
BbF	0,9170	0,7808
BkF	0,6200	0,6020
BaP	0,6370	0,7808
Db(a,h)A	0,3000	0,6798
B(g,h,i)P	0,3900	0,6385
I(1,2,3-cd)P	0,6820	0,7808

Como $C < C_{\text{crítico}}$, pode afirmar-se que existe homogeneidade de variância para os resíduos e para todos os PAH's. O composto BkF apesar de apresentar um valor de C superior ao valor crítico, pode considerar-se muito próximo, assumindo-se homogeneidade de variâncias.

Teste das Áreas Normalizadas

Para a realização deste teste foi utilizada a equação anteriormente analisada na secção 2.8.1.2, no respetivo capítulo referente, obtendo-se os resultados seguintes:

Tabela 4.38 - Teste das áreas normalizadas para o padrão BaA

Concentração (ppb)	Área pico BaA/Área do pico P.I.	Área estimada pela regressão linear	Valor experimental/valor estimado	Área Normalizada (%)
2	0,0212	0,0215	0,9877	95
1	0,0112	0,0110	1,0207	100
0,75	0,0084	0,0083	1,0068	100
0,5	0,0056	0,0057	0,9928	101
0,4	0,0048	0,0046	1,0278	107
0,3	0,0035	0,0036	0,9920	106
0,2	0,0024	0,0025	0,9460	107

Tabela 4.39 - Teste das áreas normalizadas para o padrão CHR

Concentração (ppb)	Área pico CHR/Área do pico P.I.	Área estimada pela regressão linear	Valor experimental/valor estimado	Área Normalizada (%)
2	0,0296	0,0306	0,9675	94
1	0,0156	0,0155	1,0111	99
0,75	0,0120	0,0117	1,0300	101
0,5	0,0079	0,0079	1,0036	100
0,4	0,0063	0,0064	0,9966	100
0,3	0,0043	0,0048	0,8795	90

Tabela 4.40 - Teste das áreas normalizadas para o padrão BbF

Concentração (ppb)	Área pico BbF/Área do pico P.I.	Área estimada pela regressão linear	Valor experimental/valor estimado	Área Normalizada (%)
10	0,0694	0,0698	0,9945	100
5	0,0359	0,0350	1,0245	103
2	0,0139	0,0141	0,9852	100
1	0,0073	0,0072	1,0101	104
0,75	0,0053	0,0054	0,9784	102
0,5	0,0039	0,0037	1,0590	113

Tabela 4.41 - Teste das áreas normalizadas para o padrão BkF

Concentração (ppb)	Área pico BkF/Área do pico P.I.	Área estimada pela regressão linear	Valor experimental/valor estimado	Área Normalizada (%)
10	0,8066	0,8074	0,9989	100
5	0,4055	0,4037	1,0043	100
2	0,1617	0,1615	1,0010	100
1	0,0812	0,0808	1,0056	100
0,75	0,0600	0,0606	0,9897	99
0,5	0,0401	0,0404	0,9918	99
0,4	0,0321	0,0324	0,9918	99
0,3	0,0242	0,0243	0,9964	100
0,2	0,0158	0,0162	0,9745	98
0,1	0,0084	0,0081	1,0305	104

Tabela 4.42 - Teste das áreas normalizadas para o padrão BaP

Concentração (ppb)	Área pico BaP/Área do pico P.I.	Área estimada pela regressão linear	Valor experimental/valor estimado	Área Normalizada (%)
2	0,0969	0,0976	0,9922	97
1	0,0477	0,0490	0,9724	96
0,75	0,0374	0,0369	1,0157	100
0,5	0,0246	0,0247	0,9943	98
0,4	0,0197	0,0198	0,9928	99
0,3	0,0150	0,0150	0,9990	100

Tabela 4.43 - Teste das áreas normalizadas para o padrão Db(a,h)A

Concentração (ppb)	Área pico BbF/Área do pico P.I.	Área estimada pela regressão linear	Valor experimental/valor estimado	Área Normalizada (%)
2	0,0699	0,0697	1,0029	100
1	0,0354	0,0350	1,0137	101
0,75	0,0259	0,0263	0,9855	99
0,5	0,0172	0,0176	0,9753	98
0,4	0,0137	0,0141	0,9675	98
0,3	0,0108	0,0106	1,0131	103
0,2	0,0071	0,0072	0,9938	102
0,1	0,0039	0,0037	1,0563	112

Tabela 4.44 - Teste das áreas normalizadas para o padrão B(g,h,i)P

Concentração (ppb)	Área pico BbF/Área do pico P.I.	Área estimada pela regressão linear	Valor experimental/valor estimado	Área Normalizada (%)
10	0,1097	0,1096	1,0012	95
5	0,0546	0,0548	0,9960	94
2	0,0218	0,0220	0,9908	94
1	0,0111	0,0111	0,9986	95
0,75	0,0086	0,0083	1,0281	99
0,5	0,0057	0,0056	1,0230	99
0,4	0,0043	0,0045	0,9604	93
0,3	0,0035	0,0034	1,0183	100
0,2	0,0023	0,0023	1,0002	100

Tabela 4.45 - Teste das áreas normalizadas para o padrão I(1,2,3-cd)P

Concentração (ppb)	Área pico BbF/Área do pico P.I.	Área estimada pela regressão linear	Valor experimental/valor estimado	Área Normalizada (%)
10	0,0158	0,0157	1,0077	99
7	0,0109	0,0111	0,9823	97
5	0,0080	0,0080	1,0053	100
2	0,0033	0,0033	0,9853	102
1	0,0018	0,0018	1,0215	112
0,9	0,0014	0,0016	0,8946	100

A azul está representado o valor que mais se aproxima de 1, sendo utilizados os valores da área do pico e concentração correspondente para o cálculo dos valores de área normalizada. Como os valores de área normalizada se apresentam dentro dos valores aceitáveis (85-115%), conclui-se que também através deste teste, existe linearidade da curva de calibração para os oito PAH's.

Teste de Mandel

Por fim, realizou-se também o teste de Mandel, no qual se obteve os resultados apresentados em seguida. As tabelas completas, assim como o polinómio que foi aplicado a cada composto, encontram-se em anexos, no capítulo referente (ANEXO E, tabelas E.1 a E.8).

Tabela 4.46 - Resultados finais do Teste de Mandel para o composto BaA

Ajuste Linear		Ajuste polinomial			
soma (y-yi) ²	1,62E-07	soma (y-yi) ²	8,10E-08	DS ²	8,07E-08
N-2	5	N-3	4	VT	3,985
Sy/x	1,80E-04	Sy ²	1,42E-04	F(1,N-3)95%	7,709

Tabela 4.47 - Resultados finais do Teste de Mandel para o composto CHR

Ajuste Linear		Ajuste polinomial			
soma (y-yi) ²	1,49E-06	soma (y-yi) ²	5,11E-07	DS ²	9,75E-07
N-2	4	N-3	3	VT	5,725
Sy/x	6,10E-04	Sy ²	4,13E-04	F(1,N-3)95%	10,130

Tabela 4.48 - Resultados finais do Teste de Mandel para o composto BbF

Ajuste Linear		Ajuste polinomial			
soma (y-yi) ²	9,94E-07	soma (y-yi) ²	7,00E-07	DS ²	2,95E-07
N-2	4	N-3	3	VT	1,264
Sy/x	4,99E-04	Sy ²	4,83E-04	F(1,N-3)95%	10,130

Tabela 4.49 - Resultados finais do Teste de Mandel para o composto BkF

Ajuste Linear		Ajuste polinomial			
soma (y-yi) ²	4,72E-06	soma (y-yi) ²	2,98E-06	DS ²	1,74E-06
N-2	8	N-3	7	VT	4,084
Sy/x	7,68E-04	Sy ²	6,52E-04	F(1,N-3)95%	5,591

Tabela 4.50 - Resultados finais do Teste de Mandel para o composto BaP

Ajuste Linear		Ajuste polinomial			
soma (y-yi) ²	2,79E-06	soma (y-yi) ²	1,61E-06	DS ²	1,18E-06
N-2	4	N-3	3	VT	2,205
Sy/x	8,35E-04	Sy ²	7,32E-04	F(1,N-3)95%	10,130

Tabela 4.51 - Resultados finais do Teste de Mandel para o composto Db(a,h)A

Ajuste Linear		Ajuste polinomial			
soma (y-yi) ²	8,79E-07	soma (y-yi) ²	8,05E-07	DS ²	7,48E-08
N-2	6	N-3	5	VT	0,465
Sy/x	3,83E-04	Sy ²	4,01E-04	F(1,N-3)95%	6,608

Tabela 4.52 - Resultados finais do Teste de Mandel para o composto B(g,h,i)P

Ajuste Linear		Ajuste polinomial			
soma (y-yi) ²	2,14E-07	soma (y-yi) ²	3,98E-07	DS ²	-1,84E-07
N-2	7	N-3	6	VT	-2,7784
Sy/x	1,75E-04	Sy ²	2,58E-04	F(1,N-3)95%	5,987

Tabela 4.53 - Resultados finais do Teste de Mandel para o composto I(1,2,3-cd)P

Ajuste Linear		Ajuste polinomial			
soma (y-yi) ²	8,74E-08	soma (y-yi) ²	1,24E-07	DS ²	-3,69E-08
N-2	4	N-3	3	VT	-0,8907
Sy/x	1,48E-04	Sy ²	2,04E-04	F(1,N-3)95%	10,130

A tabela 4.54 apresenta os dados resumidos do teste de Mandel, para uma mais fácil análise dos resultados finais para cada um dos compostos.

Tabela 4.54 - Tabela resumo do teste de Mandel

Composto	VT	F(1,N-3)95%
BaA	3,985	7,709
CHR	5,725	10,130
BbF	1,264	10,130
BkF	4,084	5,591
BaP	2,205	10,130
Db(a,h)A	0,465	6,608
B(g,h,i)P	-2,778	5,987
I(1,2,3-cd)P	-0,891	10,130

Através dos resultados finais, verifica-se que, para todos os compostos, VT<F, de modo que a função de calibração é linear também para o teste de Mandel, para os 8 PAH's.

4.2.2. Limiares Analíticos

4.2.2.1. Limites de Detecção e Quantificação

Para o cálculo do limite de detecção foi utilizada a equação da secção 2.8.2.1, que envolve o declive das retas de calibração obtidas inicialmente, assim como o desvio padrão residual. No caso dos limites de quantificação, estes foram calculados inicialmente, após a realização das curvas de calibração, utilizando a equação apresentada na secção 2.8.2.2. Assim, obtiveram-se os seguintes resultados, apresentados na tabela 4.55, para cada um dos oito compostos:

Tabela 4.55 - Limites de Detecção e Quantificação para os oito PAH's

Composto	Limite de Detecção - L.D. (ppb)	Limite de Quantificação - L.Q. (ppb)
BaA	0,07	0,20
CHR	0,11	0,33
BbF	0,17	0,52
BkF	0,03	0,10
BaP	0,09	0,28
Db(ah)A	0,04	0,12
B(ghi)P	0,05	0,15
I(123cd)P	0,29	0,88

4.3. Identificação de Problemas

Equipamentos como o UPLC ou HPLC são equipamentos que devem estar em constante utilização. Caso tal não aconteça, e o equipamento se encontre parado durante longos períodos, antes de retomar a sua utilização, aconselha-se uma manutenção geral ao equipamento de modo a evitar muitos dos problemas que possam mais tarde vir a surgir, como foi o caso.

Ao longo da realização deste trabalho, surgiram diversos problemas que não permitiram terminar a validação. Tentou-se isolar e identificar as causas de maneira a resolver os problemas que iam ocorrendo, sendo os mais relevantes discutidos neste trabalho.

Os primeiros problemas que surgiram (detetor de fluorescência, bombas, injetor e coluna), deveram-se, muito provavelmente, a microorganismos que se desenvolveram na água utilizada como fase móvel, levando à sua presença e acumulação nas tubagens e diferentes peças do equipamento, devido ao facto deste se encontrar parado durante algum tempo. Os seguintes problemas, com as bombas, deveram-se ao uso de solventes não adequados. As válvulas e pistões encontravam-se com acumulação de impurezas (figura 4.43), o que levou a acreditar que seria do uso de solventes não filtrados.

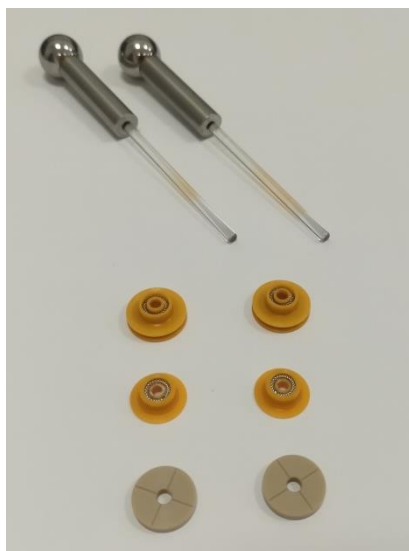


Figura 4.43 - Visualização dos pistões desgastados (amarelados) e peças com acumulação de partículas

Assim, os solventes da fase móvel deveriam ser filtrados por uma membrana 0,2 μm . Passaram assim, a ser utilizados estes solventes filtrados, e ainda, a solução de lavagem dos pistões foi trocada para uma solução 100% Metanol, evitando assim que se desenvolvessem microorganismos na solução que anteriormente era Água:Metanol (90:10). No caso do penúltimo problema, novamente com a coluna, levou-se a crer, inicialmente que seria um problema de fabrico desta. Por fim, o último problema deveu-se muito provavelmente à lâmpada do detetor de fluorescência. Em anexo, tabela F.1, encontra-se uma tabela resumo dos problemas que surgiram.

Estes problemas foram sendo identificados ao longo da realização do trabalho, através dos sintomas que foram surgindo e que serão explicados seguidamente.

Inicialmente, na realização das curvas de calibração, ao injetar as diferentes concentrações de um padrão, começa por surgir um problema nos tempos de retenção. Sendo o mesmo padrão a ser injetado, o tempo de retenção deveria ser o mesmo, o que não aconteceu, como se visualiza na figura 4.44. Havia desvios no tempo de retenção, o que levou a suspeitar de algum problema.

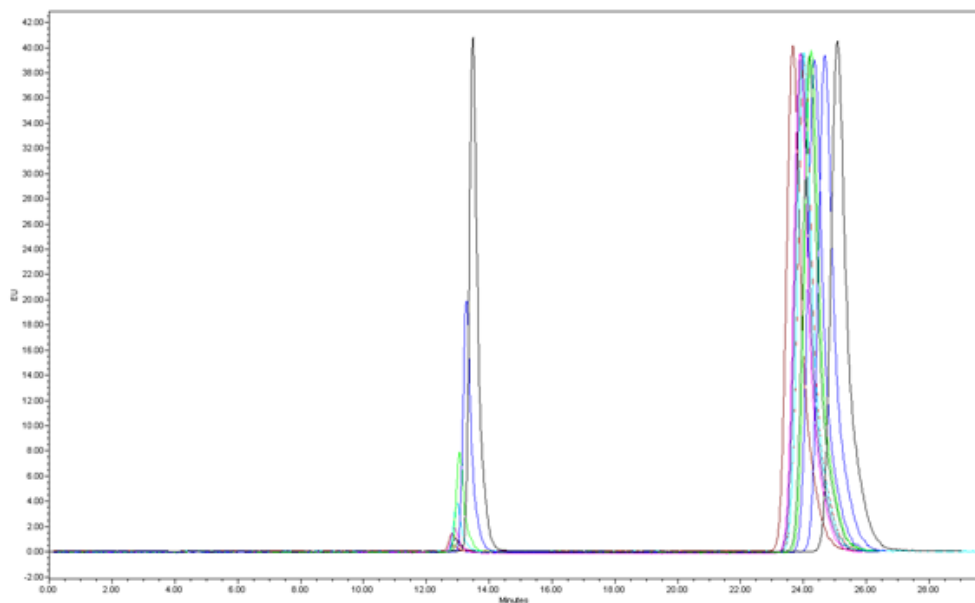


Figura 4.44 - Visualização dos desvios nos tempos de retenção para o padrão BaP

Das causas possíveis para este problema, a mais comum seria um problema relacionado com as bombas. Outro sinal indicativo era o facto do valor de DeltaPsi estar constantemente com valores muito elevados, por volta das centenas, quando deveria apresentar valores de diferença de pressão abaixo de 10. Na figura 4.45 é possível verificar as elevadas oscilações da pressão.

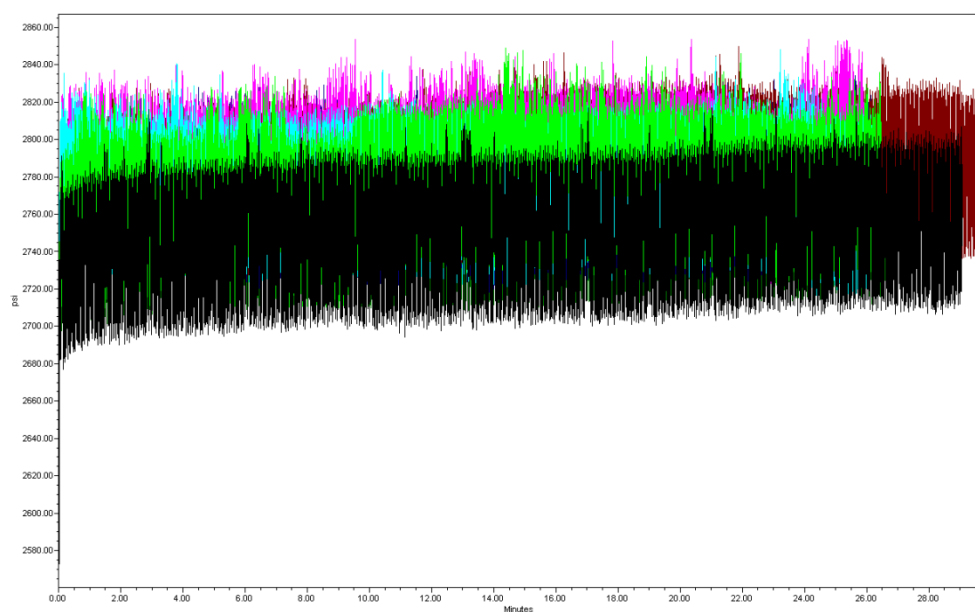


Figura 4.45 - Visualização das oscilações de pressão para algumas concentrações do padrão BaP

DeltaPsi indica a oscilação da pressão, entre o seu valor mínimo e máximo durante um determinado tempo, sendo um indicador de bom ou mau funcionamento das bombas, devendo o seu valor ser continuamente controlado ao longo de qualquer corrida do cromatograma. Com isto, foi realizado um teste às bombas, na qual estas são comprimidas até uma certa pressão e é devolvido o resultado, se

passou no teste ou não. No fim da realização do teste, o resultado foi negativo, não passou no teste, comprovando que as bombas não estava a fazer pressão suficiente.

O segundo problema mais relevante surgiu também na parte inicial, na realização das curvas de calibração. Para a mesma concentração de padrão interno (representado à direita, no gráfico da figura 4.46, aproximadamente aos 11,5 min), as áreas dos padrões injetados deveriam apresentar o mesmo valor, o que não se verificou. As áreas deram valores muito diferentes dos anteriores, valores muito mais baixos e com grandes diferenças entre si. À esquerda no gráfico da mesma figura (aproximadamente aos 9,2 min) está representado o padrão B(ghi)P, na gama de concentrações 10 – 0,3 ppb.

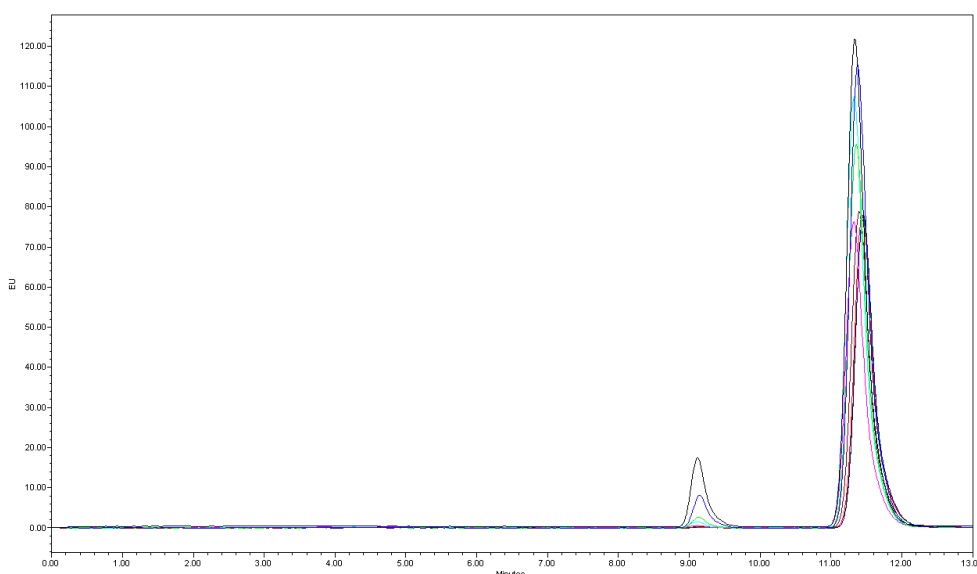


Figura 4.46 - Visualização das diferentes áreas, para a mesma concentração de padrão interno BbC

Diferenças no valor das áreas, para uma mesma concentração de padrão, estão relacionadas com diferentes volume de injeção.

O volume de injeção estava programado para 40 μ L, de modo que foi realizado um teste com o objetivo de verificar se o volume de injeção estaria a ser o programado.

O teste consistiu em pesar inicialmente um *vial* com água, fazer 6 injeções e voltar a pesar o *vial* após as injeções. Através do peso final e da densidade da água, tirou-se o valor de quanto volume é que foi realmente injetado, dividindo-se o total pelo número de injeções efetuadas. Após os cálculos chegou-se à conclusão que estava a ser injetado um volume muito inferior (~26 μ L) ao estabelecido.

Assim, o sistema de injeção teve de ser substituído, pois também não passou nos testes ao injetor.

Também a coluna apresentou problemas, que se identificaram pela observação de um aumento de pressão gradual a cada injeção realizada ao longo do tempo. Os fatores que podem influenciar a pressão são: a coluna, fase móvel, fluxo e temperatura.^[65] Ao longo de todas as análises apresentadas na figura 4.47, estava a ser utilizada uma fase móvel de 100% Acetonitrilo, o fluxo

manteve-se constante, assim como a temperatura, de modo que apenas restou a coluna como a causa do aumento de pressão.

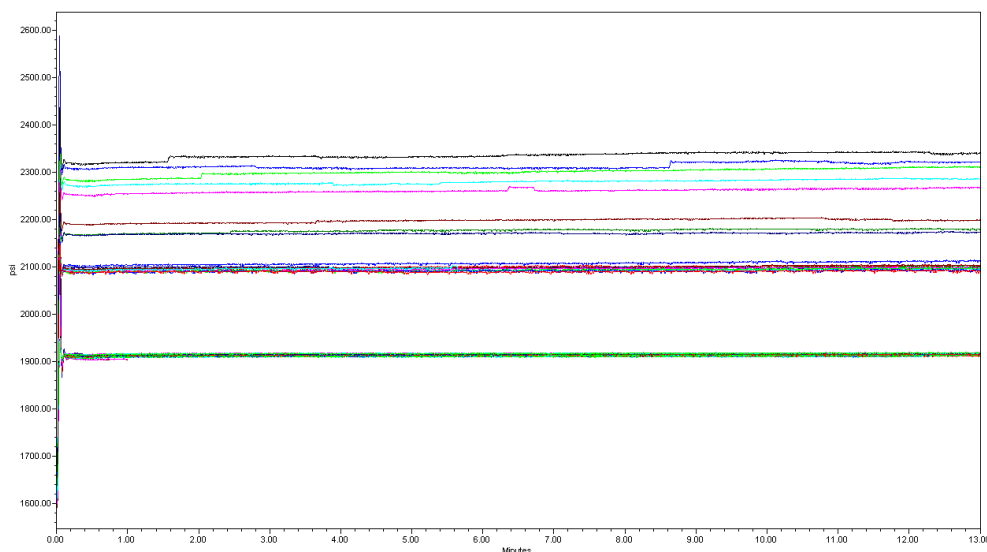


Figura 4.47 - Aumento da pressão ao longo de várias injeções

A ordem cronológica é de baixo para cima, o que indica que ao longo do tempo, houve um aumento muito acentuado da pressão. Não havendo nenhuma segunda coluna para fazer o despiste, foi realizada uma limpeza à coluna através da passagem de água e com aumento de temperatura. Ao longo do tempo, depois desta limpeza, a pressão continuou a aumentar, tendo a coluna de ser substituída.

Depois de detetadas as causas dos problemas referidos, estes poderam ser resolvidos através da substituição dos componentes do equipamento em mau funcionamento.

Quando todos os outros problemas estavam resolvidos, surgiu um novo que se identificou pela diminuição da área do pico, após sucessivas injeções. Este problema ocorreu no ponto de determinação da gama de trabalho aquando da validação do método em estudo. Foram analisados quatro padrões, Benzo(a)Antraceno, Benzo(a)Pireno, Dibenzo(a,h)Antraceno e Benzo(ghi)Perileno, obtendo-se os resultados apresentados nas tabelas 4.56 a 4.59.

Tabela 4.56 - Injeções de 2 ppb de BaA

	BaA 2 ppb	P.I.	Área do pico BaA/Área do pico P.I.
N=10	649082	27613135	0,02351
	626875	27089844	0,02314
	614150	26471163	0,02320
	600771	25964068	0,02314
	609199	25550841	0,02384
	577480	24575743	0,02350
	560342	23959054	0,02339
	532891	23614137	0,02257
	543955	23291129	0,02335
	529277	22801251	0,02321
Média	584402	25093037	0,02328
Desv.pad	41780	1681450	0,00033
RSD (%)	7,1	6,7	1,4

Tabela 4.57 - Injeções de 2 ppb de BaP

	BaP 2 ppb	P.I.	Área do pico BaP/Área do pico P.I.
N=10	1364356	22272432	0,06126
	1332079	22157125	0,06012
	1284487	21795191	0,05893
	1267861	21149195	0,05995
	1243379	20836270	0,05967
	1208818	20635841	0,05858
	1175166	20301563	0,05789
	1153633	20254474	0,05696
	1110760	19715674	0,05634
	1090557	19413102	0,05618
Média	1223110	20853087	0,05859
Desv.pad	91608	987002	0,00172
RSD (%)	7,5	4,7	2,9

Tabela 4.58 - Injeções de 0,1 ppb de Db(a,h)A

	Db(ah)A 0,1ppb	P.I.	Área do pico Db(ah)A/Área do pico P.I.
N=10	89536	19233697	0,00466
	83564	18901251	0,00442
	74717	18701192	0,00400
	79717	18449551	0,00432
	78789	18178956	0,00433
	85332	17860394	0,00478
	70117	17765323	0,00395
	78979	17736416	0,00445
	86270	17491563	0,00493
	81490	17232022	0,00473
Média	80851	18155037	0,00446
Desv.pad	5721	650814	0,00032
RSD (%)	7,1	3,6	7,3

Tabela 4.59 - Injeções de 5 ppb de B(g,h,i)P

	B(ghi)P 5 ppb	P.I.	Área do pico B(ghi)P/Área do pico P.I.
N=10	935303	15510772	0,06030
	903442	15295938	0,05906
	893740	15063233	0,05933
	875742	14869415	0,05890
	872090	14739458	0,05917
	860791	14622788	0,05887
	851709	14619073	0,05826
	856943	14632637	0,05856
	836768	14369239	0,05823
	829307	14264112	0,05814
Média	871584	14798667	0,05888
Desv.pad	32161	393529	0,00065
RSD (%)	3,7	2,7	1,1

Não só pela observação direta do valor das áreas, que apresenta ser sucessivamente mais baixo, como pelos valores do desvio padrão relativo (RSD) calculados, é evidente que se está perante um problema, sendo necessário identificar as causas e resolver o problema de modo a ser possível prosseguir com a validação do método. Para tal, foi construído um diagrama de Ishikawa, representado na figura 4.48. A vermelho estão representados os fatores muito críticos, considerados os que se relacionam diretamente, a laranja os fatores críticos e a verde os fatores não críticos.

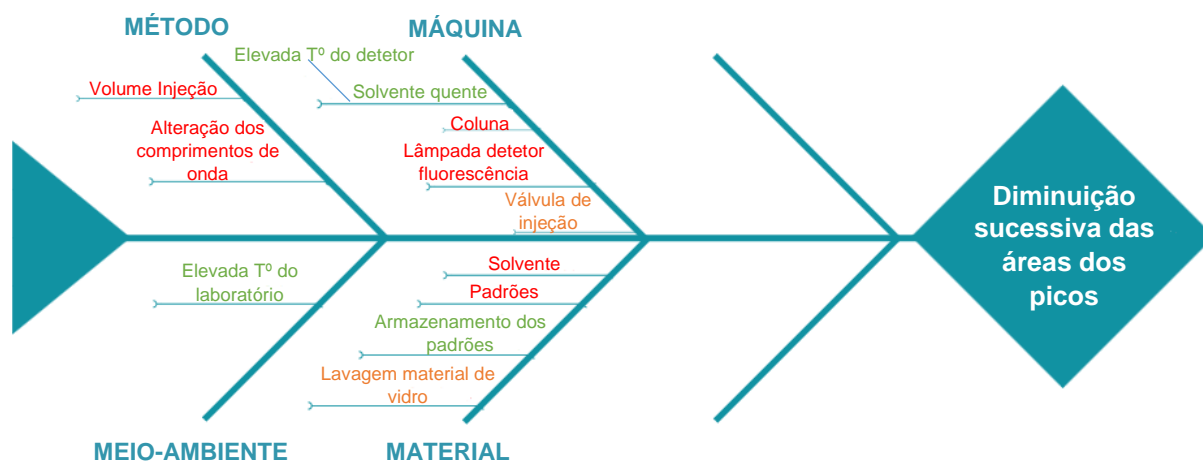


Figura 4.48 - Diagrama de Ishikawa/Espinha de peixe para identificação das possíveis causas do problema^[66]

Como se pode verificar, há diversos fatores que podem estar relacionados com o problema, sendo inicialmente destacados, dentro das categorias anteriores, os que podem estar mais diretamente relacionados, identificados, a vermelho, como os fatores muito críticos:

- 1) Coluna
- 2) Volume de injeção
- 3) Lâmpada do detetor de fluorescência
- 4) Alteração dos comprimentos de onda de excitação dos padrões
- 5) Solvente ou padrões a degradar a coluna

Estes pontos foram analisados um a um de modo a despistar todas as possíveis causas e ser possível a resolução do problema.

- 1) Começou por se suspeitar de um problema na coluna, pois o equipamento aparentemente não apresentava problemas e este problema ocorreu simultaneamente a outros clientes que compraram a mesma coluna, na mesma altura. Fez-se o despiste utilizando uma coluna suplente, que era a coluna que tinha sido trocada, chamada de coluna "velha", injetando o padrão Benzo(a)Pireno em duas concentrações, obtendo-se os resultados das tabelas 4.60 e 4.61. Apesar da diminuição não ter sido significativa para a concentração mais baixa, ainda assim apresentou valores de RSD muito elevados (para UPLC, normalmente os valores são à volta de 1%, sendo valores superiores a 3% considerados muito elevados).

Tabela 4.60 - Injeções de 1 ppb de BaP com a coluna "velha"

	BaP 1 ppb	P.I	Área do padrão BaP/Área do pico P.I.
N=10	1307588	27664220	0,04727
	1143999	25904113	0,04416
	1018809	25192633	0,04044
	959761	24628634	0,03897
	890581	24216974	0,03678
	856641	23914491	0,03582
	853437	23643233	0,03610
	855493	23544195	0,03634
	863267	23351553	0,03697
	779768	23238263	0,03356
Média	952934	24529831	0,03864
Desv. pad	162362	1392546	0,00422
RSD(%)	17,0	5,7	10,9

Tabela 4.61 - Injeções de 0,3 ppb de BaP com a coluna "velha"

	BaP 0,3 ppb	P.I.	Área do padrão BaP/Área do pico P.I.
N=10	230896	22955806	0,01006
	263071	23069991	0,01140
	245718	22966769	0,01070
	246470	22822364	0,01080
	228096	22906001	0,00996
	243905	22797188	0,01070
	225039	22791773	0,00987
	238714	22758330	0,01049
	235073	22747007	0,01033
	204297	22737090	0,00899
Média	236128	22855232	0,01033
Desv. pad	15710	112936,2	0,00066
RSD(%)	6,7	0,5	6,4

Ainda assim, não seria fiável este teste realizado com esta coluna, pois esta já apresentava problemas, de maneira que se optou por comprar uma nova coluna.

A nova coluna depois de testada continuou a apresentar o mesmo problema, como verificado nas tabelas 4.62 e 4.63.

Tabela 4.62 - Injeções de 2 ppb de BaA com coluna nova da Waters

	BaA 2 ppb	P.I.	Área do pico BaA/Área do pico P.I.
N=9	419590	11148843	0,03764
	396826	10408716	0,03812
	389854	9783897	0,03985
	384224	9866641	0,03894
	378613	9771753	0,03875
	373555	9637217	0,03876
	362432	9250069	0,03918
	361455	9024898	0,04005
	355835	8867603	0,04013
Média	380265	9751071	0,03905
Desv.pad	20139	704710	0,00086
RSD (%)	5,3	7,2	2,2

Tabela 4.63 - Injeções de 0,2 ppb de BaA com coluna nova da Waters

	BaA 0,2 ppb	P.I.	Área do pico BaA/Área do pico P.I.
N=4	419590	11148843	0,03764
	396826	10408716	0,03812
	389854	9783897	0,03985
	384224	9866641	0,03894
Média	397624	10302024	0,03864
Desv.pad	15525	628888	0,00097
RSD (%)	3,9	6,1	2,5

Isto levou à troca da coluna para uma de outra marca – SupelCo, em princípio suspeitando que o problema seria do fabrico das colunas.

Esta última coluna ainda apresentou o mesmo problema que anteriormente, como se verifica na tabela 4.64, podendo-se afirmar que o problema não seria da coluna.

Tabela 4.64 - Injeções de 2 ppb de BaP com coluna SupelCo

	BaP 2 ppb	P.I.	Área do pico BaP/Área do pico P.I.
N=10	2299688	28670236	0,08021
	2226309	27607315	0,08064
	2068395	26411426	0,07831
	1834102	25080123	0,07313
	1547910	23035450	0,06720
	1492842	22805763	0,06546
	1371885	21763336	0,06304
	1244902	20317804	0,06127
	1176701	19420572	0,06059
	1100366	19067755	0,05771
Média	1636310	23417978	0,06876
Desv.pad	442717	3409691	0,00865
RSD (%)	27,1	14,6	12,6

- 2) Para verificar se o volume de injeção estaria a ser o realmente programado, realizaram-se os testes programados do equipamento:

- *Calibrate Needle Seal*
- *Needle Seal Readiness*
- *Leak Test*

Também se fez um teste utilizando o peso de um *vial* com água, o qual é pesado anterior e posteriormente às injeções. No final de 6 injeções, a diferença de peso do *vial* a dividir pelas seis injeções deve dar igual ao volume de injeção programado.

$$m_{H_2O \text{ inicial}} = 4,0725g$$

$$m_{H_2O \text{ final}} = 3,8319g$$

$$\Delta m_{H_2O} = 0,2406g$$

Sabendo que $\rho_{H_2O} = 1g/cm^3 = 1g/ml$, vem:

$$\frac{0,2406}{6} = 0,0401g = 0,0401ml = 40,1\mu l$$

O injetor passou em todos os testes, assim como o teste do peso do *vial* também não apresentou problemas, pois, feitos os cálculos concluiu-se que estava a injetar o volume correto.

- 3) Para despistar se seria da lâmpada do detetor de fluorescência, fez-se injeções com um padrão conhecido de cafeína, com deteção no detetor de díodos. Realizaram-se 6 injeções intercaladas com solvente para verificar se havia *carryover*.

Condições operacionais para a cafeína:

Preparou-se uma solução de cafeína (Sigma-Aldrich) de 50 $\mu g/mL$, pesando 0,005 g de cafeína para um balão de 100 mL, perfazendo o resto com metanol.

Comprimento de onda definido no detetor de díodos: 273 nm

Fase móvel: Acetonitrilo

Fluxo: 1 mL/min e 1,5 mL/min

Volume de injeção: 40 µL

Solvente de lavagem: Metanol

Este teste foi realizado duas vezes, a primeira vez utilizando a coluna SupelCo C18 para PAH's e a segunda utilizando a coluna XBridge C18. Os resultados foram os apresentados nas tabelas 4.65 e 4.66.

Tabela 4.65 - Injeções de cafeína com detetor de díodos para despiste do detetor de fluorescência, com coluna PAH's

Área do pico cafeína		
	1 mL/min	1,5 mL/min
N=6	1552549	1843283
	3095170	1876939
	2966198	1888072
	2943106	1891291
	2933854	1879290
	2917987	1886445
Média	2734811	1877553
Desv.pad	582701	17642
RSD(%)	21,3	0,9

Verifica-se que para as primeiras 6 injeções se obteve um valor de RSD muito elevado, enquanto que para as últimas 6 já se obteve um valor de RSD aceitável. Isto poderá significar que a coluna nas primeiras injeções ainda não estaria estabilizada, e só ao fim de algum tempo começou a dar valores com menor dispersão entre eles.

Como referido anteriormente, este teste foi feito com uma injeção de metanol entre cada injeção de cafeína para verificar se havia *carryover*. Analisando os cromatogramas dos picos de cafeína e dos de metanol, conclui-se que houve *carryover*, pois os picos de solvente mostraram-se significativos. Verificou-se também que não só estes se mostraram significativos como apresentavam sinal superior ao da cafeína, o que gerou suspeitas que a agulha não estaria a ir ao *vial* incorreto. Os cromatogramas referentes a estas injeções apresentam-se em anexo (figuras F.1 – F.4). Assim, para despistar se a agulha estava a ir ao *vial* correto, nas próximas injeções abriu-se o amostrador a cada injeção para fazer essa verificação.

A coluna utilizada nas primeiras injeções, referidas anteriormente não seria a mais indicada para a análise da cafeína por ser específica para PAH's, de modo que este teste foi novamente realizado com a coluna XBridge C18. Os resultados foram os seguintes:

Tabela 4.66 - Injeções de cafeína com detetor de díodos para despiste do detetor de fluorescência, com coluna C18

		Área do pico cafeína	
		1 mL/min	1,5 mL/min
N=6		6240355	4489202
		6523237	4511079
		6483591	4522379
		6776126	4514437
		6796039	4533191
		6782715	4541195
Média		6600344	4518581
Desv.pad		224332	18308
RSD(%)		3,4	0,4

Verificou-se que a agulha estava a ir ao *via*/ correto, podendo ter sido algum erro na posição dos *vials* nas injeções anteriores.

Com estes novos valores verifica-se novamente que para as primeiras 6 injeções há ainda um valor de RSD elevado, não tanto como da primeira vez, mas também nas últimas 6 injeções, provavelmente pela mesma razão, a coluna já estaria estabilizada, resultando num valor de RSD aceitável.

A diferença que se verifica nos valores da área dos picos entre este segundo teste à cafeína e o primeiro, deve-se ao facto de não ter sido preparada outra solução de cafeína em metanol, utilizando-se a mesma que foi guardada no frio. Ainda assim, muito provavelmente houve evaporação do metanol, o que levou à concentração da cafeína e posterior aumento do valor das áreas.

Desta vez, os picos de solvente não foram tão acentuados, ainda que se tenha verificado *carryover*, o que, comparando com outras injeções realizadas para a mesma concentração de cafeína, não é normal que haja, ainda assim, valores como os obtidos para o pico de metanol. Os cromatogramas referentes encontram-se em anexo (figuras F.5 – F.8).

Para o detetor de díodos, apesar da contaminação, verifica-se que está a dar valores aceitáveis, como se verifica pelo valor de RSD calculado, de modo que, para verificar se o problema de contaminação de mantém quando se injeta padrão e também verificar se o problema se mantém, foram feitos três *sets* de injeções com o padrão BaP, obtendo-se os resultados apresentados nas tabelas 4.67 a 4.69. Para este grupo de injeções, evitou-se o contacto direto do solvente com o detetor de fluorescência, pois este aquecia fazendo aquecer também o solvente, o que poderia causar choque térmico e estar na origem dos problemas de perda de área.

Tabela 4.67 - Primeiro set para verificação de *carryover*

	Área do pico BaP	Área do pico P.I.	Área do pico BaP/Área do pico P.I.
N=6	376475	8569668	0,04393
	312896	7705332	0,04061
	282734	7610049	0,03715
	283691	7512188	0,03776
	243677	7474590	0,03260
	254980	7366861	0,03461
Média	292409	7706448	0,03778
Desv.pad	47817	438465	0,00408
RSD(%)	16,4	5,7	10,8

Tabela 4.68 - Segundo set para verificação de *carryover*

	Área do pico BaP	Área do pico P.I.	Área do pico BaP/Área do pico P.I.
N=6	197202	5771524	0,03417
	175791	4873369	0,03607
	151577	4608272	0,03289
	146885	4575176	0,03210
	119893	4307944	0,02783
	117148	4290781	0,02730
Média	151416	4737844	0,03173
Desv.pad	31238	550416	0,00350
RSD(%)	20,6	11,6	11,0

Tabela 4.69 - Terceiro set para verificação de *carryover*

	Área do pico BaP	Área do pico P.I.	Área do pico BaP/Área do pico P.I.
N=6	172334	5138028	0,03354
	158223	5115010	0,03093
	155674	5202456	0,02992
	170098	5077071	0,03350
	162686	5100064	0,03190
	162236	5326074	0,03046
Média	163542	5159784	0,03171
Desv.pad	6526	92043	0,00155
RSD(%)	4,0	1,8	4,9

Verificou-se que o valor de RSD continua muito elevado, ainda que com o frasco de solvente à temperatura ambiente. Reparou-se também que do segundo set de injeções para o terceiro, houve

uma diminuição do valor de RSD, o que leva a crer que se se continuasse a fazer mais injeções, este valor acabaria por baixar até um valor aceite, menor ou igual a 1%.

Do primeiro ao segundo *set* o valor de RSD manteve-se praticamente idêntico (muito elevado) por ter havido interrupção na corrida, pois foi trocado o frasco de solvente, e as linhas tiveram de ser purgadas. Do segundo para o terceiro *set* a corrida foi feita sem interrupções. Verificou-se também uma pequena contaminação, que pode ser desprezável por apresentar um sinal muito pequeno. Os cromatogramas correspondentes encontram-se em anexo (figuras F.9 – F.14).

De modo a verificar o pressuposto, que se as injeções continuassem, o valor de RSD haveria de baixar até um valor aceitável, foram feitos 21 *sets* de 6 injeções, de seguida, sem trocar o frasco de solvente e sem desligar a lâmpada do detetor de fluorescência.

Verificou-se ainda assim, que os valores das áreas continuavam a variar bastante, apresentando valores de RSD muito elevados. Mais ou menos a meio dos *sets*, há injeções cujos cromatogramas não apresentam nenhum pico, apenas ruído. A partir do 13º *set*, até ao último *set* de injeções, deixa de haver picos, sendo a resposta apenas ruído. As tabelas com os resultados dos *sets* das injeções apresentam-se em anexo (tabelas F.2 a F.14). Este sintoma muito provavelmente será da lâmpada do detetor que deixou de funcionar, o que anteriormente já se suspeitava devido ao tempo de vida da lâmpada que era superior a 2000h (tempo aproximado da vida da lâmpada do detetor de fluorescência).

5. Conclusões

A realização deste trabalho de implementação e validação de um método para determinação de PAH's nos óleos vegetais revela-se de elevada importância devido à natureza destes compostos (contaminantes), em termos de qualidade e segurança alimentar. Atualmente são avaliados apenas 4 PAH's, mas estudos indicam que devem ser avaliados 8 PAH's, considerados genotóxicos. Assim, a empresa pretende estar um passo à frente na determinação destes compostos, quando o número de PAH's aumentar para oito, encontrando-se nesse momento, o método implementado e validado para esses compostos.

Em relação ao método original a validar, houve certas condições operacionais, determinadas no início da experiência, que tiveram de ser alteradas, tais como o gradiente, que passou a ser isocrático, 100% acetonitrilo, a quantidade de padrão interno a injetar em cada padrão ou amostra, que foi novamente calculado, chegando-se à conclusão que seria injetado uma concentração de 25 ppb de padrão interno Benzo(b)Criseno, e por último, a temperatura da coluna foi alterada para 26°C.

O método de separação dos PAH's da matriz de óleo vegetal deste trabalho, utilizando cartuchos de impressão molecular, é um método muito mais rápido e eficiente que os métodos de extração segundo a norma, que envolve extrações líquido-líquido.

Verificou-se linearidade do método segundo os testes de RIKILT, análise de resíduos, teste das áreas normalizadas e de Mandel, para 7 dos 8 PAH's nas suas respetivas gamas de trabalho. Os compostos BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, Db(a,h)A e I(1,2,3-cd)P são lineares nas gamas 0,2 ppb – 2 ppb, 0,3 ppb – 2 ppb, 0,5 ppb – 10 ppb, 0,1 ppb – 10 ppb, 0,3 ppb – 2 ppb, 0,1 ppb – 2 ppb e 0,9 ppb – 10 ppb, respetivamente. Não foi possível ajustar a gama do composto B(g,h,i)P devido aos problemas que surgiram.

Os limiares analíticos encontram-se na tabela 4.54 da secção 4.2.2.1, sendo calculados através das equações das secções 2.8.2.1 e 2.8.2.2 para o cálculo dos limites de deteção e quantificação, respetivamente.

Não foi possível terminar a validação, de modo que ficou por concluir a precisão e exatidão do método. Assim, foram sendo diagnosticados e resolvidos os problemas que foram surgindo, fazendo-se em simultâneo a validação do método enquanto se realizava o *troubleshooting* ao equipamento.

Contudo, ainda assim é possível referir algumas melhorias ao método, a começar com o procedimento. Apesar do uso de cartuchos para a separação dos PAH's da matriz, existe um procedimento ainda mais rápido e económico, método de QuEChERS, referido na secção 6 de otimizações futuras, que envolve técnicas mais simples que as do método atual. Uma outra opção de melhoria seria a escolha de uma coluna de UPLC, ao contrário de colunas HPLC como as utilizadas neste método, diminuindo bastante o tempo de análise dos compostos. Por último também seria de elevada importância o estudo da degradação dos compostos, prevenindo alguns dos problemas que pudessem mais tarde surgir e fazendo-se uma melhor gestão do armazenamento destes compostos.

Os maiores problemas cromatográficos que surgiram no presente trabalho foram relacionados com a pressão, tempos de retenção incorretos, falta de precisão e contaminação.

Concluindo, não só é de extrema importância a validação do método para a obtenção de resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida, como é necessário que estes sejam viáveis, sendo importante que, antes da utilização de um equipamento como o UPLC, seja feita uma manutenção geral, como prevenção, de modo a diminuir todo o tempo perdido no diagnóstico e resolução dos problemas, reduzindo também os custos que isso implica à empresa.

6. Propostas de Trabalho Futuro

Ao longo da realização deste trabalho, foram surgindo ideias e opções de melhoria e otimização do método aplicado.

A técnica utilizada para a extração da matriz dos compostos a analisar é uma separação em fase sólida utilizando polímeros com impressão molecular. Uma opção muito mais barata, rápida e simples que o método utilizado para preparação da amostra, é o método de QuEChERS^[67], que consiste na simples adição de sais à amostra de óleo, adicionando previamente Acetonitrilo, seguida de aplicação de força centrífuga à mistura. Isto leva à separação da matriz, que fica dissolvida com o sal, e dos compostos de interesse, que ficam dissolvidos no Acetonitrilo. Desta maneira distinguem-se duas fases, sendo de fácil separação os compostos de interesse, podendo seguir diretamente para análise no UPLC.

Um parâmetro também de elevada importância é a coluna. A coluna utilizada no trabalho, não era de UPLC mas sim de HPLC, pois era mais comprida e o tamanho das partículas eram maiores. Uma excelente opção seria usar uma coluna mais pequena e com tamanho reduzido de poros, pois deste modo é possível uma grande redução, tanto a nível do uso de solventes como a nível de tempo de análise. Utilizando a calculadora de transferência de método^[68], é possível calcular as condições de um método de uma coluna, para outra, e assim, ver quais seriam as diferenças entre as duas colunas. Para uma coluna de dimensões 4,6 mm x 50 mm, 3,5 µm, as diferenças no método seriam as apresentadas na tabela 6.1.

Tabela 6.1 - Diferença de condições operacionais entre duas colunas

	4,6 mm x 250 mm, 5 µm	4,6 mm x 50 mm, 3,5 µm
Volume de injeção (µL)	40	8
Pressão (psi)	2000	1088
Fluxo (mL/min)	1,5	2,0
Tempo de corrida (min)	16	2,4

Tempo poupado: 13,6 min

Solvente poupado: 19,2 mL

Fazendo pequenas alterações, tanto ao método quanto à coluna, é possível obter um processo otimizado, de maneira que as opções referidas anteriormente devem ser ponderadas.

Um ponto também importante seria o estudo da degradação dos compostos para avaliar a sua estabilidade, de modo a evitar problemas que possam surgir devido à evaporação de solvente ou degradação dos padrões.

Ainda se sugere o uso de Metanol como fase móvel, em vez do Acetonitrilo, por trazer vantagens em relação ao preço, entre outras.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

7. Referências Bibliográficas

- [1] Husam, Alomirah; Sameer, Al-Zenki; Adnan, Husain; Wajih, Sawaya; Nisar, Ahmed; Bondi, Gevaio; Kurunthachalam, Kannan (2010). *Benzo[a]pyrene and total polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) levels in vegetable oils and fats do not reflect the occurrence of the eight genotoxic PAHs*, Food Additives & Contaminants: Part A, 27: 6, págs. 869 – 878
- [2] LACOSTE, Florence - *Contaminants in oils and fats: analysis and regulations*. [Projeção Visual]. [2013]. 30 Diapositivos: color.
- [3] ISO 9000:2005. Sistemas de Gestão da Qualidade – Fundamentos e vocabulário
- [4] Health & Consumer Protection Directorate-General, European Commission (2008). *Food Contaminants*. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_factsheet_en.pdf (Data da consulta: 09/06/17)
- [5] Bionity. *Food Contaminants*. Disponível em: http://www.bionity.com/en/encyclopedia/Food_contaminants.html (Data da consulta: 06/06/17)
- [6] European Commission. *Contaminants*. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/safety/chemical_safety/contaminants_en (Data da consulta: 06/06/17)
- [7] Hussein I. Abdel-Shafy e Mona S.M. Mansour (2016). *A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation*. Volume 25, publicação 1. pp. 107-123. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com> (Data da consulta: 13/07/17)
- [8] Tox Town (2017). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. Disponível em: <https://toxtown.nlm.nih.gov> (Data da consulta: 07/06/17)
- [9] Maria Concetta Bruzzoniti, Martino Fungi e Corrado Sarzanini (2010). Determination of EPA's priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking waters by solid phase extraction-HPLC. *Analytical Methods*. Publicação 6. Disponível em: <http://pubs.rsc.org> (Data da consulta: 09/06/17)
- [10] PubChem. Disponível em: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
- [11] The EFSA Journal (2008). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food, Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain*. 724: 1-114. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu> (Data da consulta: 29/06/17)
- [12] Food Safety Authority of Ireland (junho 2015). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Food*. Publicação 2. FSAI.
- [13] Agency for Toxic Substances & Disease Registry (2011). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) What Health Effects Are Associated With PAH Exposure?* ATSDR. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov> (Data da consulta: 20/06/17)
- [14] E. Węgrzyn, S. Grześkiewicz, W. Popławska, e B. K. Głód. Modified Analytical Method for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, using SEC for Sample Preparation and RP-HPLC with Fluorescence Detection. Application to Different Food Samples. *Acta Chromatographica*, no. 17, 2006. Disponível em: <http://www.us.edu.pl> (Data da consulta: 09/06/17)
- [15] Michael J. Suess (1976). The Environmental Load and Cycle of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *The Science of the Total Environment*, 6. pp. 239-250.
- [16] Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. *Contaminantes nos géneros alimentícios*. MADRP.
- [17] Inês Fernandes Lampreia (2014). *Implementação de Método em HPLC para a Determinação de PAH's em Óleos Vegetais*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica. Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa. 86 pp.
- [18] Regulamento (CE) nº 1881/2006. *Jornal Oficial da União Europeia*. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu> (Data da consulta: 12/06/17)

- [19] Ye YU, Qinze Jin e Xing Guo Wang (2013). Rapid assay of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils by HPLC with FLD detection without clean-up. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. **5(10)**: 409-414. Disponível em: <http://www.jocpr.com> (Data da consulta: 09/06/17)
- [20] Rabbi Sholom Ber Hendel (winter 2016). *What is Vegetable Oil?* Kosher Spirit, pp.14. Disponível em: <http://www.ok.org> (Data da consulta: 16/06/17)
- [21] Lúcia Rodrigues Henriques (2011). *Estabelecimento de uma metodologia de determinação do tempo de vida útil de alguns óleos vegetais*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa. 107 pp.
- [22] Gunstone, F.D. (2004). *The Chemistry of Oils and Fats: Sources, Composition, Properties and Uses*. CRC Press.
- [23] De Smet. *Oilseeds Crushing – vegetable oil extraction*. Disponível em: <http://www.dsengineers.com> (Data da consulta: 09/06/17)
- [24] Paulo Telles (2015). Degomagem – O importante processo para a remoção de fosfatídeos presentes nos óleos vegetais. *Revista Óleos & Gorduras*. Edição 1. pp. 38. Disponível em: <http://www.mflip.com.br/pub/stilo/index4/?numero=1&edicao=3112>
- [25] Passeidireto. *Degomagem*. Disponível em: <https://www.passeidireto.com/arquivo/2209596/degomagem> (Data da consulta: 20/05/17)
- [26] AG Bragante (2009). Processo de Extração de Óleos Vegetais. *Tecnologia do Processamento de Alimentos*. Disponível em: <http://abgtecalim.yolasite.com> (Data da consulta: 17/05/17)
- [27] Renato Dorsa (2000). *Tecnologia de processamento de óleos e gorduras vegetais e derivados*. 3ª Edição. Disponível em: <https://pt.slideshare.net>
- [28] Sara de Oliveira (2012). *Estudo das unidades de desgomagem e neutralização*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Instituto Superior Técnico – Universidade Técnica de Lisboa. 73 pp. Disponível em: <https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/downloadFile/395144711580> (Data da consulta: 17/05/17)
- [29] Sovena Consumer Goods Portugal (2016). *Manual de boas práticas de fabrico azeites e óleos*. 3ª Edição.
- [30] Zongqiang Gong, Kassem Alef, Berndt-Michael Wilke, Peijun Li (2007). Activated carbon adsorption of PAHs from vegetable oil used in soil remediation. *Journal of Hazardous Materials*. **143**: 372-378.
- [31] Mônica C. Rojo Camargo, Paula Ramos Antoniolli e Eduardo Vicente (2012). Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons content in different stages of soybean oils processing. *Food Chemistry*. **135**: 937-942.
- [32] Sigma Aldrich. *Guide to Solid Phase Extraction*. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf> (Data da consulta: 31/07/17)
- [33] John Morris Scientific. *ASPEC C18, 50mg, 1mL*. Disponível em: <http://www.johnmorris.com.au> (Data da consulta: 31/07/17)
- [34] Sigma Aldrich. *SupelMIP Solid Phase Extraction – Molecularly Imprinted Polymers for the Highly Selective Extraction of Trace Analytes from Complex Matrices*. Disponível em: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General_Information/t407075.pdf (Data da consulta: 31/07/17)
- [35] Michael Swartz (2007). *HPLC to UPLC Method Migration: An Overview of Key Considerations and Available Tools*. Disponível em: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002064en.pdf> (Data da consulta: 24/08/17)
- [36] Antonie J.W.G. Visser e Olaf J. Rolinski. *Basic Photophysics*. Disponível em: <http://photobiology.info> (Data da consulta: 26/07/17)

- [37] John W. Dolan (2016). *How Does It Work? Part V: Fluorescence Detectors*. Volume 34, publicação 9, pp. 710-719. Disponível em: <http://www.chromatographyonline.com> (Data da consulta: 25/07/17)
- [38] UCI Department of Chemistry (2000). *An Introduction to Fluorescence Spectroscopy*. Disponível em: <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/Fluorescence%20Spectroscopy.pdf> (Data da consulta: 25/07/17)
- [39] Don Tuite (2013). *Understanding LED Application Theory and Practice*. Disponível em: <http://www.electronicdesign.com> (Data da consulta: 26/07/17)
- [40] Microscopy Resource Center. *Overview of Fluorescence Excitation and Emission Fundamentals*. Disponível em: <http://www.olympusmicro.com> (Data da consulta: 28/07/17)
- [41] Empresas Familiares (2015). *Grupo Sovena: A história da química que levou o azeite ao mundo*. Disponível em: <http://empresasfamiliares.jn.pt> (Data da consulta: 10/07/17)
- [42] Sovena Group. Disponível em: <http://www.sovenagroup.com> (Data da consulta: 14/06/17)
- [43] Saldo Positivo. Caixa Geral de Depósitos. *Sovena: Azeite para o mundo*. Disponível em: <http://saldopositivo.cgd.pt> (Data da consulta: 14/06/17)
- [44] World Heritage Encyclopedia Edition (2002). *Sovena Group*. Disponível em: http://www.nationalpubliclibrary.org/articles/Sovena_Group (Data da consulta: 10/07/17)
- [45] Relacre (2000) Guia Relacre 13, Validação de métodos internos de ensaio em análise química. Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, pp 1-30
- [46] Eurachem (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*.
- [47] Marlene da Silva Fernandes (2016). *Validação do método de quantificação de ocratoxina A por HPLC em cereais e café no Laboratório da SGS Portugal*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa. 74 pp.
- [48] Ludwig Huber (2010). Agilent Technologies. *Validation of Analytical Methods*. Disponível em: <http://www.agilent.com> (Data da consulta: 31/07/17)
- [49] Ana João Pinto de Carvalho (2014). *Implementação e validação de um método de pesquisa e quantificação de Vitamina E por UPLC*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa. 81 pp.
- [50] Disponível em: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/252/26/20026_26_Anexos_9_RIKILT.pdf (Data da consulta: 02/08/17)
- [51] Disponível em: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/252/24/20024_24_Anexos_7_ANormaliz.pdf (Data da consulta: 18/07/17)
- [52] Universidade de Coimbra – Departamento de Física (2011). *Capítulo XI: Teste do Qui-Quadrado*. Disponível em: http://www.fis.uc.pt/data/20102011/apontamentos/apnt_5_19.pdf (Data da consulta: 08/08/17)
- [53] Zulema Lopes Pereira e José Gomes Requeijo (2012). *Qualidade: Planeamento e Controlo Estatístico de Processos*. 2ª Edição. FFCT - Fundação da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- [54] Portal Action. 1.6.1. – *Teste De Igualdade das Variâncias*. Disponível em: <http://www.portalaction.com.br> (Data da consulta: 10/08/17)
- [55] Disponível em: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/252/27/20027_27_Anexos_10_Mandel.pdf (Data da consulta: 18/07/17)
- [56] Disponível em: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/252/29/20029_29_Anexos_12_Incert.pdf (Data da consulta: 02/08/17)

- [57] Andreia Sobreiro Ferreira (2013). *Validação da Determinação de Teobromina em amostras de cacau e seus derivados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa. 74 pp.
- [58] Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://redsang.ial.sp.gov.br> (Data da consulta: 08/06/17)
- [59] Menichini E, Domenico A e Bonanni L. (1991) *Journal of Chromatography*. **555**: 211-220
- [60] MindTools. *Cause and Effect Analysis, Identifying the Likely Causes of Problems*. Disponível em: https://www.mindtools.com/pages/article/newTMC_03.htm
- [61] Disponível em: <http://www.uff.br/gqaanaliseinstrumental/principal/introducao/calibracao> (Data da consulta: 13/07/17)
- [62] Christophe Waterlot e Anaïs Goulas (2016). Temperature Effects on Retention and Separation of PAHs in Reversed-Phase Liquid Chromatography Using Columns Packed with Fully Porous and Core-Shell Particles. *Journal of Chemistry*. Volume 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com> (Data da consulta: 19/07/17)
- [63] ChromAcademy. *Optimizing Gradient HPLC Parameters*. Disponível em: <http://www.chromacademy.com/chromatography-Optimizing-Gradient-HPLC-Parameters.html> (Data da consulta: 23/08/17)
- [64] Editores de LCGC (2013). *Understanding Gradient HPLC*. Volume 31, publicação 7. pp. 578. Disponível em: <http://www.chromatographyonline.com> (Data da consulta: 23/08/17)
- [65] Waters (2014). *Troubleshooting and Diagnostics Tips and Tricks*. Disponível em: http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/local_seminar_presentations/sp_sem_uplc_troubleshooting_inst_2014.pdf (Data da consulta: 24/07/17)
- [66] Canva. Disponível em: <https://www.canva.com/>
- [67] Michael S. Young e Mark E. Benvenuti (2012). *QuEChERS Sample Preparation for the Determination of Polycyclic Hydrocarbons (PAH) in Shrimp Using LC with Fluorescence Detection*. Disponível em: <http://www.waters.com> (Data da consulta: 28/07/17)
- [68] HPLC Method Transfer Calculator. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com> (Data da consulta: 28/08/17)
- [69] Disponível em: http://www.de.ufpb.br/~ulisses/disciplinas/tabela_cochran_5.pdf (Data da consulta: 10/08/17)

Anexos

ANEXO A

Tabelas utilizadas nos testes estatísticos

Quando se estimam os parâmetros da população a partir dos dados que constituem a amostra, é utilizada a tabela A.1 criada por H.W.Lilliefors.

Tabela A.1 - Valores críticos da distribuição D de estatística Lilliefors

α					
n	0,20	0,15	0,10	0,05	0,01
4	0,300	0,319	0,352	0,381	0,417
5	0,285	0,299	0,315	0,337	0,405
6	0,265	0,277	0,294	0,319	0,364
7	0,247	0,258	0,276	0,300	0,348
8	0,233	0,244	0,261	0,285	0,331
9	0,223	0,233	0,249	0,271	0,311
10	0,215	0,224	0,239	0,258	0,294
11	0,206	0,217	0,230	0,249	0,284
12	0,199	0,212	0,223	0,242	0,275
13	0,190	0,202	0,214	0,234	0,268
14	0,183	0,194	0,207	0,227	0,261
15	0,177	0,187	0,201	0,220	0,257
16	0,173	0,182	0,195	0,213	0,250
17	0,169	0,177	0,189	0,206	0,245
18	0,166	0,173	0,184	0,200	0,239
19	0,163	0,169	0,179	0,195	0,235
20	0,160	0,166	0,174	0,190	0,231
25	0,149	0,153	0,165	0,180	0,203
30	0,131	0,136	0,144	0,161	0,187
>30	$\frac{0,736}{\sqrt{n}}$	$\frac{0,768}{\sqrt{n}}$	$\frac{0,805}{\sqrt{n}}$	$\frac{0,886}{\sqrt{n}}$	$\frac{1,031}{\sqrt{n}}$

Os valores críticos referentes ao teste de Cochran foram retirados da tabela A.2.

Tabela A.2 - Valores críticos para o teste de Cochran, nível de significância 5%^[69]

$k \backslash n$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	∞
2	0,9985	0,9750	0,9392	0,9057	0,8772	0,8534	0,8332	0,8159	0,8010	0,7880	0,7341	0,6602	0,5813	0,5000
3	0,9669	0,8709	0,7977	0,7457	0,7071	0,6771	0,6530	0,6333	0,6167	0,6025	0,5466	0,4748	0,4031	0,3333
4	0,9065	0,7679	0,6841	0,6287	0,5895	0,5598	0,5365	0,5175	0,5017	0,4884	0,4366	0,3720	0,3093	0,2500
5	0,8413	0,6838	0,5931	0,5441	0,5065	0,4783	0,4564	0,4387	0,4241	0,4118	0,3645	0,3066	0,2513	0,2000
6	0,7808	0,6161	0,5321	0,4803	0,4447	0,4194	0,3980	0,3817	0,3682	0,3568	0,3135	0,2612	0,2119	0,1667
7	0,7271	0,5612	0,4800	0,4307	0,3974	0,3726	0,3535	0,3384	0,3299	0,3154	0,2756	0,2278	0,1833	0,1429
8	0,6798	0,5157	0,4377	0,3910	0,3595	0,3362	0,3185	0,3043	0,2926	0,2829	0,2462	0,2022	0,1616	0,1250
9	0,6385	0,4775	0,4027	0,3584	0,3286	0,3067	0,2901	0,2768	0,2659	0,2568	0,2226	0,1820	0,1446	0,1111
10	0,6020	0,4450	0,3733	0,3311	0,3029	0,2823	0,2666	0,2541	0,2439	0,2353	0,2032	0,1655	0,1308	0,1000
12	0,5410	0,3924	0,3264	0,2880	0,2624	0,2439	0,2299	0,2187	0,2098	0,2020	0,1737	0,1403	0,1100	0,0833
15	0,4709	0,3346	0,2758	0,2419	0,2195	0,2034	0,1911	0,1815	0,1736	0,1671	0,1429	0,1144	0,0889	0,0667
20	0,3894	0,2705	0,2205	0,1921	0,1735	0,1602	0,1501	0,1422	0,1357	0,1303	0,1108	0,0879	0,0675	0,0500
24	0,3434	0,2354	0,1907	0,1656	0,1493	0,1374	0,1246	0,1216	0,1160	0,1113	0,0942	0,0743	0,0567	0,0417
30	0,2929	0,1980	0,1593	0,1377	0,1237	0,1137	0,1061	0,1002	0,0958	0,0921	0,0771	0,0604	0,0457	0,0333
40	0,2370	0,1576	0,1259	0,1082	0,0968	0,0887	0,0827	0,0780	0,0745	0,0713	0,0595	0,0462	0,0347	0,0250
60	0,1737	0,1131	0,0895	0,0765	0,0682	0,0625	0,0583	0,0552	0,0520	0,0497	0,0411	0,0316	0,0234	0,0167
120	0,0998	0,0632	0,0495	0,0419	0,0371	0,0337	0,0312	0,0292	0,0279	0,0266	0,0218	0,0165	0,0120	0,0083
∞	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

ANEXO B

Secção 4.1 – Pré-requisitos

Nesta secção é apresentado o varrimento feito ao composto BbF, depois de verificar que não estava a dar maior sinal no canal suposto, canal A, pré-definido pela norma.

Inicialmente, o comprimento de onda de excitação fixou-se em 200 nm e o varrimento para determinação do comprimento de onda de emissão foi feito entre os 210 e os 500 nm, obtendo-se o espectro da figura B.2.

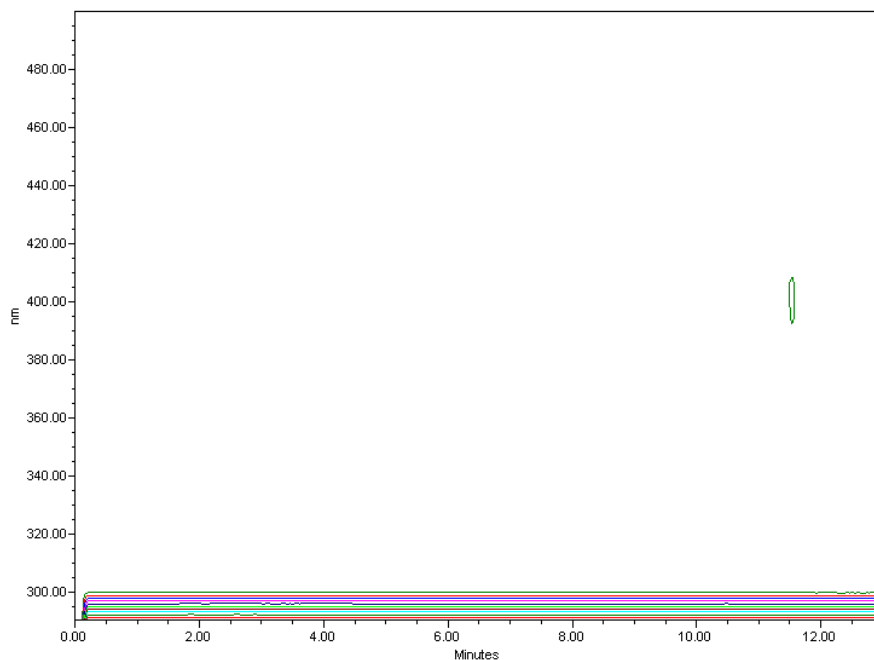


Figura B.1 - Varrimento ao padrão BbF para determinação do comprimento de onda de emissão

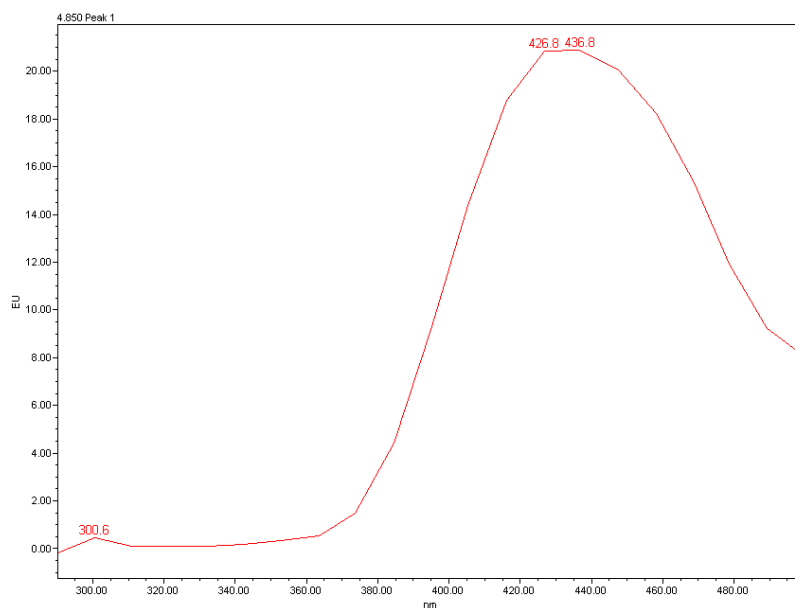


Figura B.2 - Espectro de emissão do padrão BbF

O comprimento de onda de emissão fixou-se em 437 nm e o varrimento para determinação do comprimento de onda de excitação foi feito entre os 200 e os 427 nm, obtendo-se o espectro da figura B.4. Aos 11,5 min está representado o padrão interno. O composto a analisar, BbF, está representado aos 5 min da figura B.3.

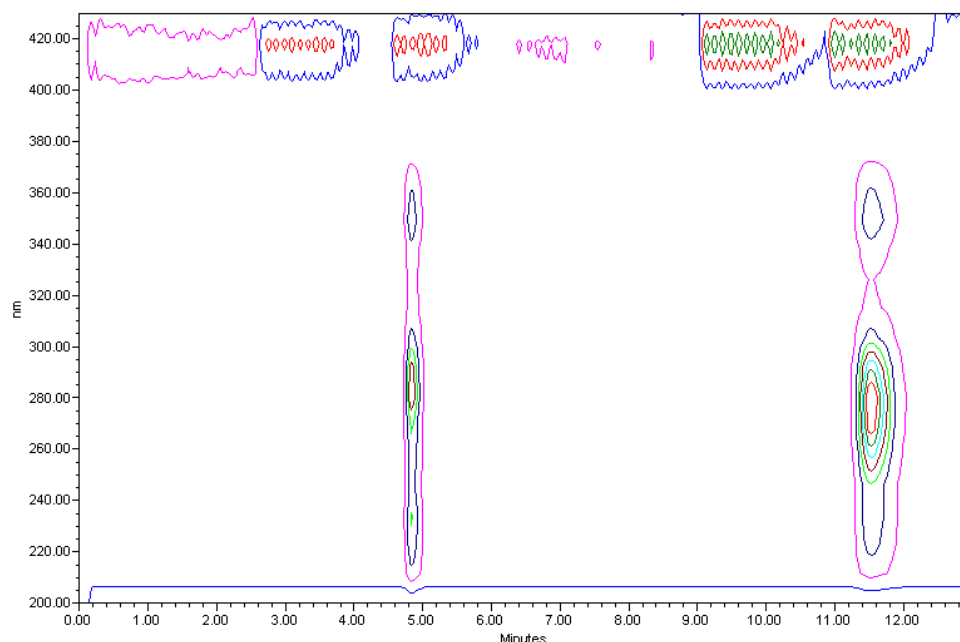


Figura B.3 - Varrimento ao padrão BbF para determinação do comprimento de onda de emissão



Figura B.4 - Espectro de excitação do padrão BbF

O gráfico da figura B.5 foi obtido com alteração dos comprimentos de onda de emissão e excitação para os novos valores obtidos após o varrimento. É possível visualizar que o padrão BbF, representado aos 4,65 min, ainda assim, apresenta maior detecção (maior área) para o canal D. A

verde está representado o canal alterado A, a preto o canal B, a azul claro o canal C e a azul escuro o canal D.

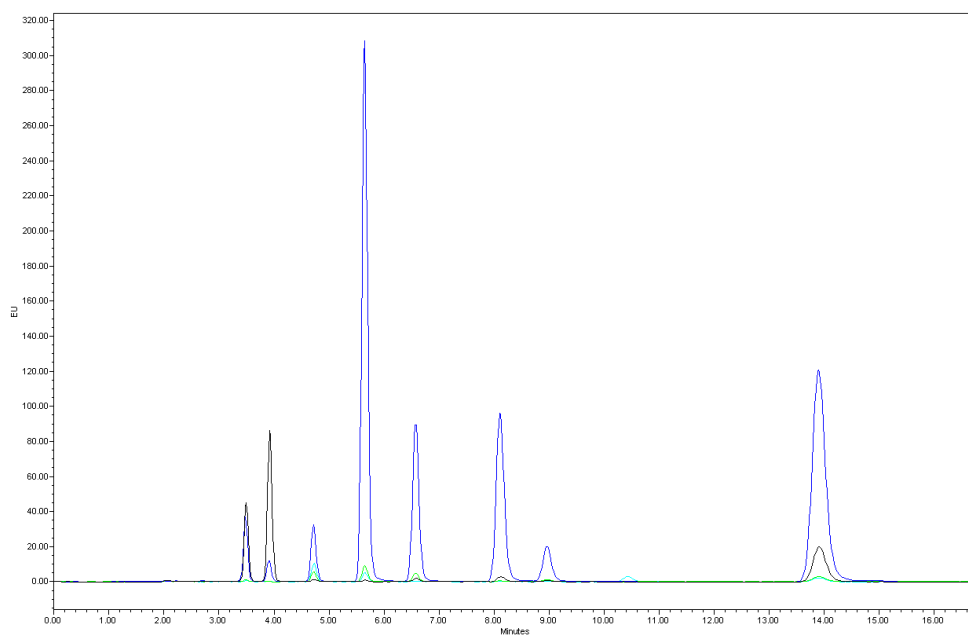


Figura B.5 - Gráfico 8 PAH's + padrão interno com canal A modificado

A tabela B.1 representa o gradiente que foi inicialmente testado no método, sendo substituído pelo gradiente final, apresentado na tabela B.2.

Tabela B.1 - Gradiente utilizado inicialmente no método

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrilo (%)
0	15	85
15	15	85
30	5	95
40	5	95
55	15	85
60	15	85

Tabela B.2 - Gradiente final utilizado no método

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrilo (%)
0	15	85
15	15	85
30	5	95
35	5	95
40	15	85
45	15	85

No gráfico apresentado pela figura B.7, a vermelho está representado o canal A, a azul-claro o canal B, a azu-escuro o canal C e a preto o canal D. Esta figura corresponde ao cromatograma referente ao gradiente da tabela B.1.

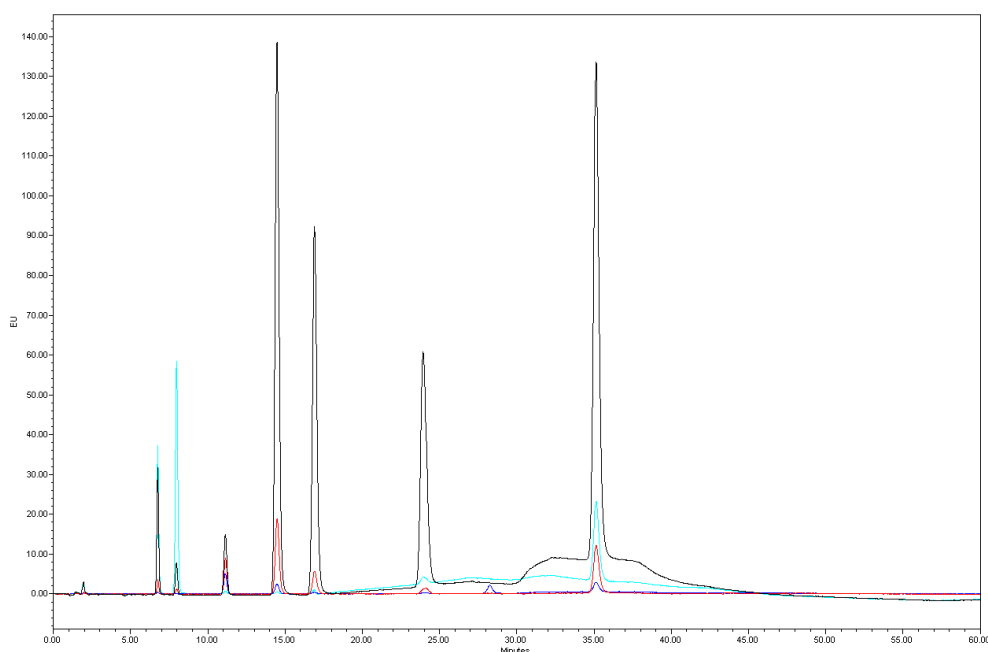


Figura B.6 - Gráfico correspondente ao gradiente utilizado inicialmente no método, correspondendo à tabela B.1

No gráfico apresentado pela figura B.6, a azul está representado o canal A, a verde o canal B, a preto o canal C e a vermelho o canal D. Esta figura corresponde ao cromatograma referente ao gradiente da tabela B.2.

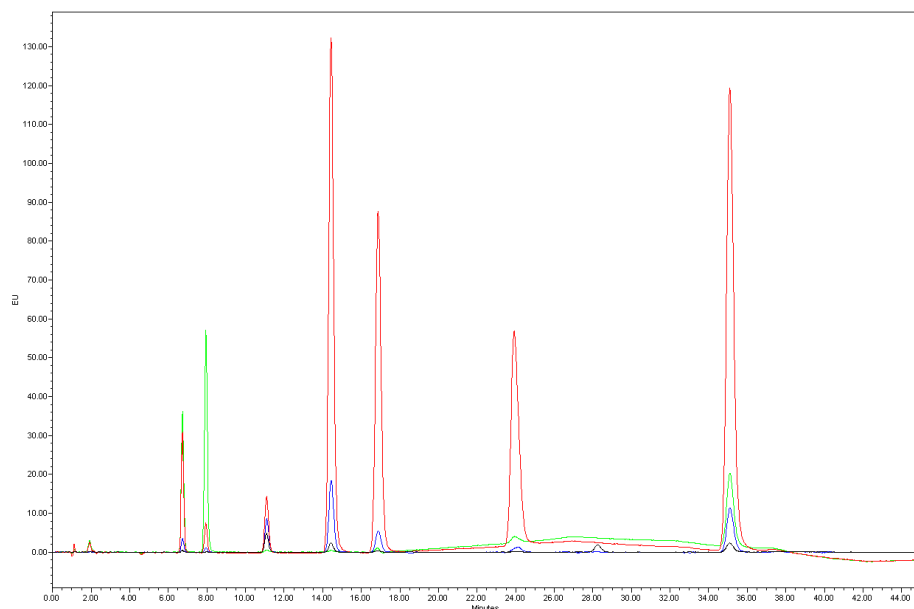


Figura B.7- Gráfico correspondente ao gradiente final do método, correspondendo à tabela B.2

A tabela B.3 representa o gradiente estimado por equações.

Tabela B.3- Gradiente estimado por equações

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrilo(%)
0	15	85
15	15	85
19	5	95
24	5	95
25	15	85
51	15	85

No gráfico apresentado pela figura B.8, a preto está representado o canal A, a verde o canal B, a azul-escuro o canal C e a azul-claro o canal D. Esta figura corresponde ao cromatograma referente ao gradiente da tabela B.3.

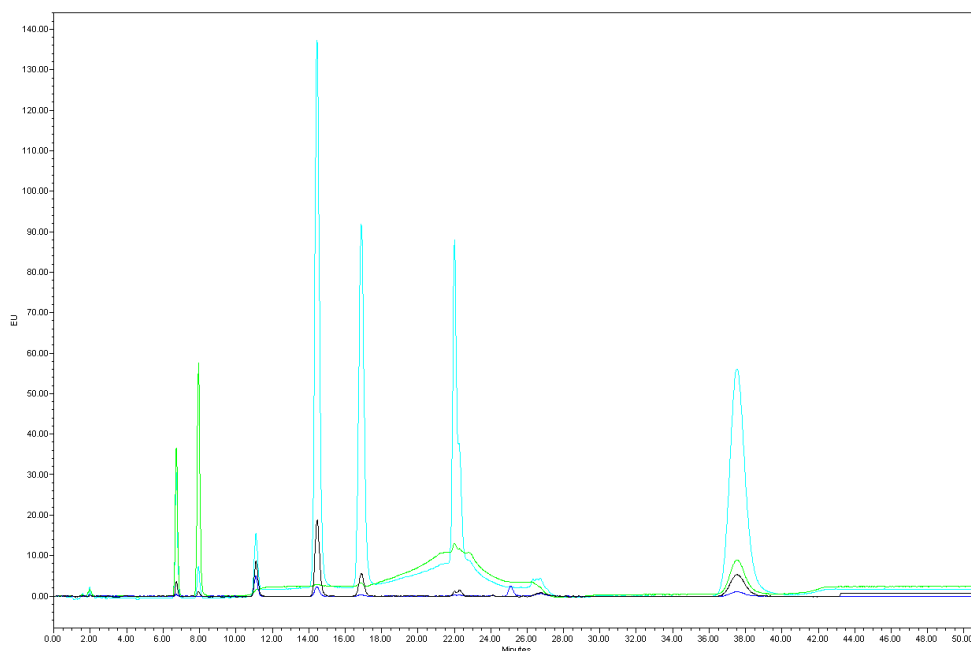


Figura B.8- Gráfico correspondente ao método estimado por equações

ANEXO C

Secção 4.2.1 - Curva de Calibração

Para a obtenção das curvas de calibração analisadas na secção 4.2.1 foram utilizados os dados das tabelas C.1 a C.8.

Tabela C.1 - Dados para a construção da curva de calibração do padrão BaA

Concentração (ppb)	Área do pico BaA	Área do pico P.I.	Área pico BaA/Área do pico P.I.	Área pico BaA/Área do pico P.I. média
10	3624678	34029463	0,10652	0,10574
5	1866787	34247257	0,05451	0,05352
2	740562	34275334	0,02161	0,02124
1	389009	34130714	0,01140	0,01119
0,75	291546	34365762	0,00848	0,00838
0,5	204453	34239869	0,00597	0,00565
0,4	164254	34225920	0,00480	0,00476
0,3	117803	34141236	0,00345	0,00355
0,2	77627	34465490	0,00225	0,00239
0,1	41081	33896789	0,00121	0,00131
10	3545435	33780714	0,10495	
5	1769014	33675363	0,05253	
2	707480	33879288	0,02088	
1	369132	33631564	0,01098	
0,75	280068	33840626	0,00828	
0,5	178633	33582891	0,00532	
0,4	160337	33961431	0,00472	
0,3	122051	33482442	0,00365	
0,2	84873	33696086	0,00252	
0,1	47012	33291301	0,00141	

Tabela C.2 - Dados para a construção da curva de calibração do padrão CHR

Concentração (ppb)	Área do pico CHR	Área do pico P.I.	Área pico CHR/Área do pico P.I.	Área pico CHR/Área do pico P.I. média
10	4694962	31063065	0,15114	0,15212
5	2430518	31682837	0,07671	0,07648
2	938301	31731320	0,02957	0,02965
1	484603	31371916	0,01545	0,01563
0,75	380664	31883136	0,01194	0,01202
0,5	244180	31690841	0,00771	0,00790
0,4	200981	31839010	0,00631	0,00633
0,3	132896	31675109	0,00420	0,00425
0,2	127856	31771348	0,00402	0,00396
0,1	64990	31425563	0,00207	0,00190
10	4887295	31922535	0,15310	
5	2444419	32062638	0,07624	
2	944619	31780626	0,02972	
1	504268	31876418	0,01582	
0,75	386172	31936671	0,01209	
0,5	260020	32134073	0,00809	
0,4	197231	31071398	0,00635	
0,3	137637	31964123	0,00431	
0,2	124067	31884308	0,00389	
0,1	55186	31795177	0,00174	

Tabela C.3 - Dados para a construção da curva de calibração do padrão BbF

Concentração (ppb)	Área do pico BbF	Área do pico P.I.	Área pico BaA/Área do pico P.I.	Área pico BbF/Área do pico P.I. média
10	2095064	30419240	0,06887	0,06940
5	1066543	29814787	0,03577	0,03586
2	417500	30086280	0,01388	0,01393
1	222734	30632550	0,00727	0,00725
0,75	161279	30174737	0,00534	0,00532
0,5	122314	30296622	0,00404	0,00392
0,4	79790	29890026	0,00267	0,00281
0,3	67070	30292404	0,00221	0,00224
0,2	49043	30617178	0,00160	0,00161
0,1	22764	30306466	0,00075	0,00075
10	2177373	31140900	0,06992	
5	1129639	31423799	0,03595	
2	429541	30733820	0,01398	
1	229565	31740148	0,00723	
0,75	166689	31447203	0,00530	
0,5	120190	31607545	0,00380	
0,4	90591	30706808	0,00295	
0,3	71279	31469870	0,00226	
0,2	50898	31497589	0,00162	
0,1	23701	31268555	0,00076	

Tabela C.4 - Dados para a construção da curva de calibração do padrão BkF

Concentração (ppb)	Área do pico BkF	Área do pico P.I.	Área pico BkF/Área do pico P.I.	Área pico BkF/Área do pico P.I. média
10	24436378	30340690	0,80540	0,80659
5	11550235	28511827	0,40510	0,40547
2	4703731	28996256	0,16222	0,16169
1	2405762	29815319	0,08069	0,08125
0,75	1664878	27873443	0,05973	0,05998
0,5	1187149	29486026	0,04026	0,04010
0,4	920733	28715319	0,03206	0,03209
0,3	696211	29045836	0,02397	0,02419
0,2	461211	29247960	0,01577	0,01579
0,1	250664	29719142	0,00843	0,00838
10	24715680	30596983	0,80778	
5	12517803	30844962	0,40583	
2	4912193	30479806	0,16116	
1	2553574	31213991	0,08181	
0,75	1837213	30498507	0,06024	
0,5	1202969	30127901	0,03993	
0,4	977642	30445133	0,03211	
0,3	752839	30840851	0,02441	
0,2	487842	30852995	0,01581	
0,1	253262	30433082	0,00832	

Tabela C.5 - Dados para a construção da curva de calibração do padrão BaP

Concentração (ppb)	Área do pico BaP	Área do pico P.I.	Área pico BaP/Área do pico P.I.	Área pico BaP/Área do pico P.I. média
10	15293780	31215431	0,48994	0,48525
5	8399395	33231320	0,25276	0,24666
2	3256572	33213615	0,09805	0,09687
1	1532623	31820529	0,04816	0,04767
0,75	1242710	32905295	0,03777	0,03744
0,5	807702	32233809	0,02506	0,02457
0,4	668340	33415177	0,02000	0,01970
0,3	491162	32094991	0,01530	0,01497
0,2	346763	33128204	0,01047	0,01029
0,1	159404	32194923	0,00495	0,00509
10	15000176	31214024	0,48056	
5	7538633	31335968	0,24057	
2	2986792	31213331	0,09569	
1	1415025	30000391	0,04717	
0,75	1170029	31520177	0,03712	
0,5	748937	31105450	0,02408	
0,4	606396	31245069	0,01941	
0,3	457594	31262706	0,01464	
0,2	316313	31274210	0,01011	
0,1	161842	30998047	0,00522	

Tabela C.6 - Dados para a construção da curva de calibração do padrão Db(a,h)A

Concentração (ppb)	Área do pico Db(ah)A	Área do pico P.I.	Área pico Db(ah)A/Área do pico P.I.	Área pico Db(ah)A/Área do pico P.I. média
10	11060679	31834992	0,34744	0,34736
5	5640575	32251851	0,17489	0,17459
2	2242204	32179093	0,06968	0,06993
1	1146821	32417589	0,03538	0,03545
0,75	806847	30931656	0,02608	0,02590
0,5	565315	32540475	0,01737	0,01716
0,4	431247	31553683	0,01367	0,01366
0,3	350311	32256588	0,01086	0,01079
0,2	236492	32042247	0,00738	0,00713
0,1	126408	32478731	0,00389	0,00391
10	11001729	31678682	0,34729	
5	5637930	32348287	0,17429	
2	2254939	32134786	0,07017	
1	1148681	32337238	0,03552	
0,75	824395	32048727	0,02572	
0,5	548384	32345822	0,01695	
0,4	434258	31788736	0,01366	
0,3	346496	32335988	0,01072	
0,2	221758	32246968	0,00688	
0,1	124828	31830884	0,00392	

Tabela C.7 - Dados para a construção da curva de calibração do padrão B(g,h,i)P

Concentração (ppb)	Área do pico B(ghi)P	Área do pico P.I.	Área pico B(ghi)P/Área do pico P.I.	Área pico B(ghi)P/Área do pico P.I. média
10	3378541	30785538	0,10974	0,10969
5	1689014	30903331	0,05465	0,05462
2	673369	31005577	0,02172	0,02181
1	341592	30707365	0,01112	0,01106
0,75	261841	31087085	0,00842	0,00857
0,5	179532	30846915	0,00582	0,00573
0,4	131045	30780801	0,00426	0,00433
0,3	106328	31019424	0,00343	0,00347
0,2	67858	31197648	0,00218	0,00232
0,1	34902	30770001	0,00113	0,00128
10	3399253	31005714	0,10963	
5	1690089	30958351	0,05459	
2	677730	30938859	0,02191	
1	339775	30926456	0,01099	
0,75	269180	30878912	0,00872	
0,5	174619	30979279	0,00564	
0,4	133947	30463586	0,00440	
0,3	109097	30997570	0,00352	
0,2	76274	31011261	0,00246	
0,1	43981	30833205	0,00143	

Tabela C.8 - Dados para a construção da curva de calibração do padrão I(1,2,3-cd)P

Concentração (ppb)	Área do pico I(123cd)P	Área do pico P.I.	Área pico I(123cd)P/Área do pico P.I.	Área pico I(123cd)P/Área do pico P.I. média
10	480476	29841797	0,01610	0,01584
7	310215	28425792	0,01091	0,01087
5	242310	30711300	0,00789	0,00801
2	101387	29925314	0,00339	0,00326
1	52886	29346871	0,00180	0,00180
0,9	41640	29679494	0,00140	0,00144
0,8	48963	30181071	0,00162	0,00153
0,7	35967	29486398	0,00122	0,00143
10	468565	30084078	0,01558	
7	311333	28764878	0,01082	
5	244629	30124503	0,00812	
2	93926	29950270	0,00314	
1	53711	29950518	0,00179	
0,9	44512	30315480	0,00147	
0,8	43144	29992306	0,00144	
0,7	49131	30111774	0,00163	

ANEXO D

Secção 4.2.1.2 - Linearidade – Análise de resíduos

As tabelas D.1 a D.8, seguidamente apresentadas foram utilizadas para a construção dos gráficos e tabelas dos testes estatísticos da parte da análise de resíduos referida na secção 4.2.1.2.

Tabela D.1 - Dados utilizados para análise de resíduos BaA

Concentração (ppb)	Área pico BaA/Área do pico P.I.	Valores previstos	Resíduos	Resíduos por ordem	Ordem de experiências	Frequências Acumuladas Observadas (%)	Frequências Acumuladas Observadas	Dados Normalizados	Frequências Acumuladas Observadas (por ordem)	Dados Normalizados (por ordem)
2	0,02161	0,02124	3,62E-04	-3,62E-04	4	25,0	0,250	-0,670	0,036	-1,800
1	0,01140	0,01119	2,11E-04	-3,26E-04	7	46,4	0,464	-0,090	0,107	-1,240
0,75	0,00848	0,00838	1,04E-04	-2,11E-04	2	10,7	0,107	-1,240	0,179	-0,915
0,5	0,00597	0,00565	3,26E-04	-1,33E-04	14	96,4	0,964	1,800	0,250	-0,670
0,4	0,00480	0,00476	3,90E-05	-1,04E-04	8	53,6	0,536	0,090	0,321	-0,465
0,3	0,00345	0,00355	-9,74E-05	-9,74E-05	13	89,3	0,893	1,240	0,393	-0,270
0,2	0,00225	0,00239	-1,33E-04	-3,90E-05	1	3,6	0,036	-1,800	0,464	-0,090
2	0,02088	0,02124	-3,62E-04	3,90E-05	9	60,7	0,607	0,270	0,536	0,090
1	0,01098	0,01119	-2,11E-04	9,74E-05	10	67,9	0,679	0,465	0,607	0,270
0,75	0,00828	0,00838	-1,04E-04	1,04E-04	11	75,0	0,750	0,670	0,679	0,465
0,5	0,00532	0,00565	-3,26E-04	1,33E-04	6	39,3	0,393	-0,270	0,750	0,670
0,4	0,00472	0,00476	-3,90E-05	2,11E-04	3	17,9	0,179	-0,915	0,821	0,915
0,3	0,00365	0,00355	9,74E-05	3,26E-04	5	32,1	0,321	-0,465	0,893	1,240
0,2	0,00252	0,00239	1,33E-04	3,62E-04	12	82,1	0,821	0,915	0,964	1,800

Tabela D.2 - Dados utilizados para análise de resíduos CHR

Concentração (ppb)	Área pico CHR/Área do pico P.I.	Valores previstos	Resíduos di	Resíduos por ordem	Ordem de experiências	Frequências Acumuladas Observadas (%)	Frequências Acumuladas Observadas	Dados Normalizados	Frequências Acumuladas Observadas (por ordem)	Dados Normalizados (por ordem)
2	0,02957	0,02965	-7,65E-05	-1,93E-04	3	20,8	0,208	-0,815	0,042	-1,730
1	0,01545	0,01563	-1,86E-04	-1,86E-04	6	45,8	0,458	-0,105	0,125	-1,150
0,75	0,01194	0,01202	-7,62E-05	-7,65E-05	1	4,2	0,042	-1,730	0,208	-0,815
0,5	0,00771	0,00790	-1,93E-04	-7,62E-05	12	95,8	0,958	1,730	0,292	-0,550
0,4	0,00631	0,00633	-1,76E-05	-5,52E-05	7	54,2	0,542	0,105	0,375	-0,320
0,3	0,00420	0,00425	-5,52E-05	-1,76E-05	11	87,5	0,875	1,150	0,458	-0,105
2	0,02972	0,02965	7,65E-05	1,76E-05	8	62,5	0,625	0,320	0,542	0,105
1	0,01582	0,01563	1,86E-04	5,52E-05	9	70,8	0,708	0,550	0,625	0,320
0,75	0,01209	0,01202	7,62E-05	7,62E-05	10	79,2	0,792	0,815	0,708	0,550
0,5	0,00809	0,00790	1,93E-04	7,65E-05	5	37,5	0,375	-0,320	0,792	0,815
0,4	0,00635	0,00633	1,76E-05	1,86E-04	2	12,5	0,125	-1,150	0,875	1,150
0,3	0,00431	0,00425	5,52E-05	1,93E-04	4	29,2	0,292	-0,550	0,958	1,730

Tabela D.3 - Dados utilizados para análise de resíduos BbF

Concentração (ppb)	Área pico BbF/Área do pico P.I.	Valores previstos	Resíduos	Resíduos por ordem	Ordem de experiências	Frequências Acumuladas Observadas (%)	Frequências Acumuladas Observadas	Dados Normalizados	Frequências Acumuladas Observadas (por ordem)	Dados Normalizados (por ordem)
10	0,06887	0,06940	-5,24E-04	-5,24E-04	3	20,8	0,208	-0,815	0,042	-1,730
5	0,03577	0,03586	-8,81E-05	-1,17E-04	6	45,8	0,458	-0,105	0,125	-1,150
2	0,01388	0,01393	-4,97E-05	-8,81E-05	1	4,2	0,042	-1,730	0,208	-0,815
1	0,00727	0,00725	1,93E-05	-4,97E-05	12	95,8	0,958	1,730	0,292	-0,550
0,75	0,00534	0,00532	2,21E-05	-2,21E-05	7	54,2	0,542	0,105	0,375	-0,320
0,5	0,00404	0,00392	1,17E-04	-1,93E-05	11	87,5	0,875	1,150	0,458	-0,105
10	0,06992	0,06940	5,24E-04	1,93E-05	8	62,5	0,625	0,320	0,542	0,105
5	0,03595	0,03586	8,81E-05	2,21E-05	9	70,8	0,708	0,550	0,625	0,320
2	0,01398	0,01393	4,97E-05	4,97E-05	10	79,2	0,792	0,815	0,708	0,550
1	0,00723	0,00725	-1,93E-05	8,81E-05	5	37,5	0,375	-0,320	0,792	0,815
0,75	0,00530	0,00532	-2,21E-05	1,17E-04	2	12,5	0,125	-1,150	0,875	1,150
0,5	0,00380	0,00392	-1,17E-04	5,24E-04	4	29,2	0,292	-0,550	0,958	1,730

Tabela D.4 - Dados utilizados para análise de resíduos BkF

Concentração (ppb)	Área pico BkF/Área do pico P.I.	Valores previstos	Resíduos	Resíduos por ordem	Ordem de experiências	Frequências Acumuladas Observadas (%)	Frequências Acumuladas Observadas	Dados Normalizados	Frequências Acumuladas Observadas (por ordem)	Dados Normalizados (por ordem)
10	0,80540	0,80659	-1,19E-03	-1,19E-03	10	47,5	0,475	-0,060	0,025	-1,960
5	0,40510	0,40547	-3,63E-04	-5,60E-04	16	77,5	0,775	0,750	0,075	-1,440
2	0,16222	0,16169	5,28E-04	-5,28E-04	5	22,5	0,225	-0,750	0,125	-1,150
1	0,08069	0,08125	-5,60E-04	-3,63E-04	9	42,5	0,425	-0,190	0,175	-0,930
0,75	0,05973	0,05998	-2,55E-04	-2,55E-04	2	7,5	0,075	-1,440	0,225	-0,750
0,5	0,04026	0,04010	1,66E-04	-2,21E-04	19	92,5	0,925	1,440	0,275	-0,600
0,4	0,03206	0,03209	-2,37E-05	-1,66E-04	11	52,5	0,525	0,060	0,325	-0,450
0,3	0,02397	0,02419	-2,21E-04	-5,62E-05	18	87,5	0,875	1,150	0,375	-0,320
0,2	0,01577	0,01579	-2,14E-05	-2,37E-05	1	2,5	0,025	-1,960	0,425	-0,190
0,1	0,00843	0,00838	5,62E-05	-2,14E-05	8	37,5	0,375	-0,320	0,475	-0,060
10	0,80778	0,80659	1,19E-03	2,14E-05	20	97,5	0,975	1,960	0,525	0,060
5	0,40583	0,40547	3,63E-04	2,37E-05	4	17,5	0,175	-0,930	0,575	0,190
2	0,16116	0,16169	-5,28E-04	5,62E-05	12	57,5	0,575	0,190	0,625	0,320
1	0,08181	0,08125	5,60E-04	1,66E-04	14	67,5	0,675	0,450	0,675	0,450
0,75	0,06024	0,05998	2,55E-04	2,21E-04	15	72,5	0,725	0,600	0,725	0,600
0,5	0,03993	0,04010	-1,66E-04	2,55E-04	7	32,5	0,325	-0,450	0,775	0,750
0,4	0,03211	0,03209	2,37E-05	3,63E-04	3	12,5	0,125	-1,150	0,825	0,930
0,3	0,02441	0,02419	2,21E-04	5,28E-04	6	27,5	0,275	-0,600	0,875	1,150
0,2	0,01581	0,01579	2,14E-05	5,60E-04	17	82,5	0,825	0,930	0,925	1,440
0,1	0,00832	0,00838	-5,62E-05	1,19E-03	13	62,5	0,625	0,320	0,975	1,960

Tabela D.5 - Dados utilizados para análise de resíduos BaP

Concentração (ppb)	Área pico BaP/Área do pico P.I.	Valores previstos	Resíduos	Resíduos por ordem	Ordem de experiências	Frequências Acumuladas Observadas (%)	Frequências Acumuladas Observadas	Dados Normalizados	Frequências Acumuladas Observadas (por ordem)	Dados Normalizados (por ordem)
2	0,09805	0,09687	1,18E-03	-1,18E-03	4	21,9	0,219	-0,780	0,025	-1,865
1	0,04816	0,04767	4,99E-04	-4,99E-04	8	46,9	0,469	-0,075	0,075	-1,315
0,75	0,03777	0,03744	3,23E-04	-4,90E-04	2	9,4	0,094	-1,315	0,125	-1,010
0,5	0,02506	0,02457	4,90E-04	-3,33E-04	16	96,9	0,969	1,865	0,219	-0,780
0,4	0,02000	0,01970	2,97E-04	-3,23E-04	9	53,1	0,531	0,075	0,225	-0,580
0,3	0,01530	0,01497	3,33E-04	-2,97E-04	15	90,6	0,906	1,315	0,275	-0,400
0,2	0,01047	0,01029	1,77E-04	-1,77E-04	1	3,1	0,031	-1,865	0,325	-0,240
0,1	0,00495	0,00509	-1,35E-04	-1,35E-04	7	40,6	0,406	-0,240	0,375	-0,075
2	0,09569	0,09687	-1,18E-03	1,35E-04	10	59,4	0,594	0,240	0,425	0,075
1	0,04717	0,04767	-4,99E-04	1,77E-04	12	71,9	0,719	0,580	0,475	0,240
0,75	0,03712	0,03744	-3,23E-04	2,97E-04	13	78,1	0,781	0,780	0,525	0,400
0,5	0,02408	0,02457	-4,90E-04	3,23E-04	6	34,4	0,344	-0,400	0,575	0,580
0,4	0,01941	0,01970	-2,97E-04	3,33E-04	3	15,6	0,156	-1,010	0,625	0,780
0,3	0,01464	0,01497	-3,33E-04	4,90E-04	5	28,1	0,281	-0,580	0,675	1,010
0,2	0,01011	0,01029	-1,77E-04	4,99E-04	14	84,4	0,844	1,010	0,725	1,315
0,1	0,00522	0,00509	1,35E-04	1,18E-03	11	65,6	0,656	0,400	0,775	1,865

Tabela D.6 - Dados utilizados para análise de resíduos Db(a,h)A

Concentração (ppb)	Área pico Db(ah)A/Área do pico P.I.	Valores previstos	Resíduos	Resíduos por ordem	Ordem de experiências	Frequências Acumuladas Observadas (%)	Frequências Acumuladas Observadas	Dados Normalizados	Frequências Acumuladas Observadas (por ordem)	Dados Normalizados (por ordem)
2	0,06968	0,06993	-2,46E-04	-2,52E-04	4	21,9	0,219	-0,780	0,031	-1,865
1	0,03538	0,03545	-7,27E-05	-2,46E-04	8	46,9	0,469	-0,075	0,094	-1,315
0,75	0,02608	0,02590	1,81E-04	-2,09E-04	2	9,4	0,094	-1,315	0,156	-1,010
0,5	0,01737	0,01716	2,09E-04	-1,81E-04	16	96,9	0,969	1,865	0,219	-0,780
0,4	0,01367	0,01366	3,17E-06	-7,27E-05	9	53,1	0,531	0,075	0,281	-0,580
0,3	0,01086	0,01079	7,23E-05	-7,23E-05	15	90,6	0,906	1,315	0,344	-0,400
0,2	0,00738	0,00713	2,52E-04	-1,48E-05	1	3,1	0,031	-1,865	0,406	-0,240
0,1	0,00389	0,00391	-1,48E-05	-3,17E-06	7	40,6	0,406	-0,240	0,469	-0,075
2	0,07017	0,06993	2,46E-04	3,17E-06	10	59,4	0,594	0,240	0,531	0,075
1	0,03552	0,03545	7,27E-05	1,48E-05	12	71,9	0,719	0,580	0,594	0,240
0,75	0,02572	0,02590	-1,81E-04	7,23E-05	13	78,1	0,781	0,780	0,656	0,400
0,5	0,01695	0,01716	-2,09E-04	7,27E-05	6	34,4	0,344	-0,400	0,719	0,580
0,4	0,01366	0,01366	-3,17E-06	1,81E-04	3	15,6	0,156	-1,010	0,781	0,780
0,3	0,01072	0,01079	-7,23E-05	2,09E-04	5	28,1	0,281	-0,580	0,844	1,010
0,2	0,00688	0,00713	-2,52E-04	2,46E-04	14	84,4	0,844	1,010	0,906	1,315
0,1	0,00392	0,00391	1,48E-05	2,52E-04	11	65,6	0,656	0,400	0,969	1,865

Tabela D.7 - Dados utilizados para análise de resíduos B(g,h,i)P

Concentração (ppb)	Área pico B(ghi)P/Área do pico P.I.	Valores previstos	Resíduos	Resíduos por ordem	Ordem de experiências	Frequências Acumuladas Observadas (%)	Frequências Acumuladas Observadas	Dados Normalizados	Frequências Acumuladas Observadas (por ordem)	Dados Normalizados (por ordem)
10	0,10974	0,10969	5,57E-05	-1,47E-04	9	47,2	0,472	-0,070	0,028	-1,915
5	0,05465	0,05462	3,12E-05	-1,42E-04	14	75,0	0,750	0,670	0,083	-1,850
2	0,02172	0,02181	-9,39E-05	-9,39E-05	5	25,0	0,250	-0,670	0,139	-1,380
1	0,01112	0,01106	6,88E-05	-9,17E-05	8	41,7	0,417	-0,210	0,194	-0,860
0,75	0,00842	0,00857	-1,47E-04	-6,98E-05	2	8,3	0,083	-1,380	0,250	-0,670
0,5	0,00582	0,00573	9,17E-05	-6,88E-05	17	91,7	0,917	1,380	0,306	-0,510
0,4	0,00426	0,00433	-6,98E-05	-5,57E-05	10	52,8	0,528	0,070	0,361	-0,355
0,3	0,00343	0,00347	-4,59E-05	-4,59E-05	16	86,1	0,861	1,090	0,417	-0,210
0,2	0,00218	0,00232	-1,42E-04	-3,12E-05	1	2,8	0,028	-1,915	0,472	-0,070
10	0,10963	0,10969	-5,57E-05	3,12E-05	18	97,2	0,972	1,915	0,528	0,070
5	0,05459	0,05462	-3,12E-05	4,59E-05	4	19,4	0,194	-0,860	0,583	0,210
2	0,02191	0,02181	9,39E-05	5,57E-05	11	58,3	0,583	0,210	0,639	0,355
1	0,01099	0,01106	-6,88E-05	6,88E-05	12	63,9	0,639	0,355	0,694	0,510
0,75	0,00872	0,00857	1,47E-04	6,98E-05	13	69,4	0,694	0,510	0,750	0,670
0,5	0,00564	0,00573	-9,17E-05	9,17E-05	7	36,1	0,361	-0,355	0,806	0,860
0,4	0,00440	0,00433	6,98E-05	9,39E-05	3	13,9	0,139	-1,850	0,861	1,090
0,3	0,00352	0,00347	4,59E-05	1,42E-04	6	30,6	0,306	-0,510	0,917	1,380
0,2	0,00246	0,00232	1,42E-04	1,47E-04	15	80,6	0,806	0,860	0,972	1,915

Tabela D.8 - Dados utilizados para análise de resíduos I(1,2,3-cd)P

Concentração (ppb)	Área pico I(123cd)P/Área do pico P.I.	Valores previstos	Resíduos	Resíduos por ordem	Ordem de experiências	Frequências Acumuladas Observadas (%)	Frequências Acumuladas Observadas	Dados Normalizados	Frequências Acumuladas Observadas (por ordem)	Dados Normalizados (por ordem)
10	0,01610	0,01584	2,63E-04	-2,63E-04	6	45,8	0,458	-0,100	0,031	-1,730
7	0,01091	0,01087	4,49E-05	-1,26E-04	10	79,2	0,792	0,815	0,094	-1,150
5	0,00789	0,00801	-1,15E-04	-1,15E-04	3	20,8	0,208	-0,815	0,156	-0,815
2	0,00339	0,00326	1,26E-04	-4,49E-05	5	37,5	0,375	-0,320	0,219	-0,550
1	0,00180	0,00180	4,39E-06	-3,27E-05	1	4,2	0,042	-1,730	0,281	-0,320
0,9	0,00140	0,00144	-3,27E-05	-4,39E-06	11	87,5	0,875	1,150	0,344	-0,100
10	0,01558	0,01584	-2,63E-04	4,39E-06	12	95,8	0,958	1,730	0,406	0,100
7	0,01082	0,01087	-4,49E-05	3,27E-05	2	12,5	0,125	-1,150	0,469	0,320
5	0,00812	0,00801	1,15E-04	4,49E-05	7	54,2	0,542	0,100	0,531	0,550
2	0,00314	0,00326	-1,26E-04	1,15E-04	8	62,5	0,625	0,320	0,594	0,815
1	0,00179	0,00180	-4,39E-06	1,26E-04	9	70,8	0,708	0,550	0,656	1,150
0,9	0,00147	0,00144	3,27E-05	2,63E-04	4	29,2	0,292	-0,550	0,719	1,730

ANEXO E

Secção 4.2.1.2. - Linearidade – Teste de Mandel

De seguida são apresentadas as tabelas E.1 a E.8 utilizadas na realização do teste de Mandel para cada um dos oito compostos, assim como os respetivos polinómios de 2º grau para cada composto.

Tabela E.1 - Tabela com dados utilizados no teste de Mandel para o composto BaA

Concentração	Sinal	Ajuste Linear	$(y-y_i)^2$	Ajuste Polinomial	$(y-y_i)^2$
0,2	0,00239	0,00252	1,85E-08	0,00246	6,16E-09
0,3	0,00355	0,00358	8,21E-10	0,00358	1,31E-09
0,4	0,00476	0,00463	1,66E-08	0,00470	4,11E-09
0,5	0,00565	0,00569	1,67E-09	0,00580	2,40E-08
0,75	0,00838	0,00832	3,22E-09	0,00853	2,11E-08
1	0,01119	0,01096	5,14E-08	0,01120	1,77E-10
2	0,02124	0,02151	6,95E-08	0,02140	2,42E-08

Para o BaA, o polinómio de 2º grau que se ajusta aos pontos é dado pela expressão:

$$y = - 0,0004 x^2 + 0,0114 x + 0,0002$$

Tabela E.2 - Tabela com dados utilizados no teste de Mandel para o composto CHR

Concentração	Sinal	Ajuste Linear	$(y-y_i)^2$	Ajuste Polinomial	$(y-y_i)^2$
0,3	0,00425	0,00483	3,39E-07	0,00488	3,91E-07
0,4	0,00633	0,00635	4,57E-10	0,00644	1,30E-08
0,5	0,00790	0,00787	8,25E-10	0,00800	1,03E-08
0,75	0,01202	0,01167	1,23E-07	0,01184	3,17E-08
1	0,01563	0,01546	2,97E-08	0,01560	1,11E-09
2	0,02965	0,03064	9,94E-07	0,02990	6,42E-08

Para o CHR, o polinómio de 2º grau que se ajustava aos pontos é dado pela expressão:

$$y = - 0,0006 x^2 + 0,0161 x + 0,0001$$

Tabela E.3 - Tabela com dados utilizados no teste de Mandel para o composto BbF

Concentração	Sinal	Ajuste Linear	$(y-y_i)^2$	Ajuste Polinomial	$(y-y_i)^2$
0,5	0,00392	0,00370	4,77E-08	0,00359	1,09E-07
0,75	0,00532	0,00544	1,39E-08	0,00540	6,37E-09
1	0,00725	0,00718	5,26E-09	0,00721	1,76E-09
2	0,01393	0,01414	4,36E-08	0,01439	2,15E-07
5	0,03586	0,03500	7,36E-07	0,03545	1,68E-07
10	0,06940	0,06978	1,48E-07	0,06895	1,99E-07

Para o BbF, o polinómio de 2º grau que se ajusta aos pontos é dado pela expressão:

$$y = -4E-05 x^2 + 0,0073 x - 5E-05$$

Tabela E.4 - Tabela com dados utilizados no teste de Mandel para o composto BkF

Concentração	Sinal	Ajuste Linear	$(y-y_i)^2$	Ajuste Polinomial	$(y-y_i)^2$
0,1	0,00838	0,00813	6,15E-08	0,00765	5,32E-07
0,2	0,01579	0,01620	1,71E-07	0,01580	3,59E-11
0,3	0,02419	0,02428	7,76E-09	0,02394	6,15E-08
0,4	0,03209	0,03235	6,97E-08	0,03209	5,24E-12
0,5	0,04010	0,04043	1,09E-07	0,04023	1,75E-08
0,75	0,05998	0,06061	3,92E-07	0,06057	3,48E-07
1	0,08125	0,08080	2,06E-07	0,08091	1,15E-07
2	0,16169	0,16153	2,45E-08	0,16214	2,02E-07
5	0,40547	0,40375	2,95E-06	0,40475	5,13E-07
10	0,80659	0,80744	7,27E-07	0,80550	1,19E-06

Para o BkF, o polinómio de 2º grau que se ajusta aos pontos é dado pela expressão:

$$y = -9E-05 x^2 + 0,0815 x - 0,0005$$

Tabela E.5 - Tabela com dados utilizados no teste de Mandel para o composto BaP

Concentração	Sinal	Ajuste Linear	$(y-y_i)^2$	Ajuste Polinomial	$(y-y_i)^2$
0,3	0,01497	0,01498	2,15E-10	0,01515	3,05E-08
0,4	0,01970	0,01985	2,03E-08	0,01988	3,08E-08
0,5	0,02457	0,02471	1,99E-08	0,02463	3,31E-09
0,75	0,03744	0,03686	3,36E-07	0,03653	8,32E-07
1	0,04767	0,04902	1,83E-06	0,04850	6,96E-07
2	0,09687	0,09764	5,87E-07	0,09700	1,70E-08

Para o BaP, o polinómio de 2º grau que se ajustava aos pontos é dado pela expressão:

$$y = 0,0005 x^2 + 0,047 x + 0,001$$

Tabela E.6 - Tabela com dados utilizados no teste de Mandel para o composto Db(a,h)A

Concentração	Sinal	Ajuste Linear	$(y-y_i)^2$	Ajuste Polinomial	$(y-y_i)^2$
0,1	0,0039	0,00370	4,34E-08	0,00364	7,01E-08
0,2	0,0071	0,00717	1,98E-09	0,00709	1,66E-09
0,3	0,0108	0,01065	1,95E-08	0,01054	6,24E-08
0,4	0,0137	0,01412	2,11E-07	0,01399	1,08E-07
0,5	0,0172	0,01760	1,89E-07	0,01745	8,22E-08
0,75	0,0259	0,02628	1,45E-07	0,02611	4,35E-08
1	0,0354	0,03497	2,28E-07	0,03480	4,21E-07
2	0,0699	0,06972	4,22E-08	0,06980	1,56E-08

Para o Db(a,h)A, o polinómio de 2º grau que se ajusta aos pontos é dado pela expressão:

$$y = 0,0002 x^2 + 0,0344 x + 0,0002$$

Tabela E.7 - Tabela com dados utilizados no teste de Mandel para o composto B(g,h,i)P

Concentração	Sinal	Ajuste Linear	$(y-y_i)^2$	Ajuste Polinomial	$(y-y_i)^2$
0,2	0,0023	0,00232	1,23E-13	0,00236	1,86E-09
0,3	0,0035	0,00341	3,89E-09	0,00344	1,07E-09
0,4	0,0043	0,00451	3,18E-08	0,00452	3,78E-08
0,5	0,0057	0,00560	1,65E-08	0,00560	1,58E-08
0,75	0,0086	0,00834	5,50E-08	0,00831	6,99E-08
1	0,0111	0,01107	2,53E-10	0,01101	2,05E-09
2	0,0218	0,02201	4,10E-08	0,02184	8,08E-10
5	0,0546	0,05484	4,79E-08	0,05445	3,01E-08
10	0,1097	0,10956	1,75E-08	0,10920	2,39E-07

Para o B(g,h,i)P, o polinómio de 2º grau que se ajusta aos pontos é dado pela expressão:

$$y = 1E-05 x^2 + 0,0108 x + 0,0002$$

Tabela E.8 - Tabela com dados utilizados no teste de Mandel para o composto I(1,2,3-cd)P

Concentração	Sinal	Ajuste Linear	$(y-y_i)^2$	Ajuste Polinomial	$(y-y_i)^2$
0,9	0,0014	0,00160	2,86E-08	0,00155	1,38E-08
1	0,0018	0,00176	1,44E-09	0,00170	8,78E-09
2	0,0033	0,00331	2,36E-09	0,00322	2,12E-09
5	0,0080	0,00796	1,80E-09	0,00780	4,21E-08
7	0,0109	0,01106	3,84E-08	0,01090	7,69E-10
10	0,0158	0,01572	1,48E-08	0,01560	5,66E-08

Para o I(1,2,3-cd)P, o polinómio de 2º grau que se ajusta aos pontos é dado pela expressão:

$$y = 4E-06 x^2 + 0,0015 x + 0,0002$$

ANEXO F

Secção 2.8.1.1. – Gama de Trabalho

Nesta secção vão ser apresentadas as tabelas utilizadas na construção da gama de trabalho, incluindo as concentrações mais altas que foram inicialmente testadas, antes da redução da gama para alguns dos compostos.

Tabela F.1 - Tabela utilizada na construção da gama de trabalho do composto BaA

	Área dos picos					
	BaA 0,2 ppb	P.I.	BaA 2 ppb	P.I.	BaA 10 ppb	P.I.
N=10	55601	24390723	524399	24094308	3036719	29499537
	56792	24243663	538613	24559532	3022251	29523624
	58881	24453506	547305	25795275	3029834	29586002
	53193	24566133	540000	25540576	3007451	29603106
	50283	24463644	545625	25475186	3018237	29704786
	52642	24734312	545537	25099034	3021143	29805104
	54863	24505459	539097	24913614	3011338	29737111
	53379	24648042	537954	24693927	3017213	29699552
	55381	24740695	540317	24485597	2998379	29679123
	52290	24918443	538584	24529419	3015708	29559786

Tabela F.2 - Tabela utilizada na construção da gama de trabalho do composto CHR

	Área dos picos					
	CHR 0,3 ppb	P.I.	CHR 2 ppb	P.I.	CHR 10 ppb	P.I.
N=10	147529	29583570	568946	27724112	5557569	31960773
	142651	29703473	569014	27734454	5511270	31485450
	150703	30408765	564800	28006387	5473506	31392569
	153994	30179268	566829	28277257	5373633	31167647
	156572	30248194	574678	28323859	5323565	31505508
	155430	30319219	578828	28580313	5270078	30932725
	154229	30349215	581181	28752901	5238223	30864561
	153027	29761349	581738	28748360	5205157	30876514
	145532	29271906	586616	28985762	5151065	30420016
	140879	29416065	573091	29154523	4976533	29952720

Tabela F.3 - Tabela utilizada na construção da gama de trabalho do composto BbF

	Área dos picos			
	BbF 0,5 ppb	P.I.	BbF 10 ppb	P.I.
N=10	115024	31101632	2173799	30847228
	116147	31165226	2166460	30879893
	117490	31159357	2176646	30908835
	104082	31308752	2182119	30916056
	121426	31265987	2181069	30988224
	108105	31313614	2184697	31026475
	111396	31382658	2189727	31157271
	118438	31437814	2201348	31219420
	114902	31496241	2211514	31317276
	111396	31548985	2206240	31275650

Tabela F.4 - Tabela utilizada na construção da gama de trabalho do composto BkF

	Área dos picos			
	BkF 0,1 ppb	P.I.	BkF 10 ppb	P.I.
N=10	250866	28540270	24397980	29816774
	249775	28526629	24434073	29874485
	253047	28487749	24533253	29976964
	249145	28660706	24445802	29913561
	250244	28679045	24490362	29963092
	248817	28648473	24535236	30023382
	267329	28764367	24613263	30117839
	253257	28872282	24627692	30094665
	261943	28982283	24654249	30125797
	249569	28946467	24696094	30206658

Tabela F.5 - Tabela utilizada na construção da gama de trabalho do composto BaP

	Área dos picos					
	BaP 0,3 ppb	P.I.	BaP 2 ppb	P.I.	BaP 10 ppb	P.I.
N=10	230896	22955806	4088115	43041887	14811045	33252427
	263071	23069991	4004713	42185041	14688033	32790387
	245718	22966769	4027715	42314219	14795515	33012940
	246470	22822364	4069395	42622755	14924664	33052062
	228096	22906001	4063281	42507789	15195635	33502715
	243905	22797188	4020908	42197316	15198565	33572569
	225039	22791773	3711182	41702600	15395606	33915509
	238714	22758330	3826774	41220023	15275548	33628659
	235073	22747007	3772580	40488411	15298936	33685050
	204297	22737090	3753000	40359052	15336050	33834786

Tabela F.6 - Tabela utilizada na construção da gama de trabalho do composto Db(a,h)A

	Área dos picos					
	Db(ah)A 0,1 ppb	P.I.	Db(ah)A 2 ppb	P.I.	Db(ah)A 10 ppb	P.I.
N=10	89536	19233697	2937149	40455966	12064405	32783422
	83564	18901251	2938540	40425138	12123985	32779257
	74717	18701192	2911299	40439903	12411846	33980972
	79717	18449551	2916878	40548132	12553662	34472516
	78789	18178956	2936019	40706529	12588096	34677116
	85332	17860394	2938490	40815826	12729092	34792629
	70117	17765323	2934444	41171838	14286622	39160900
	78979	17736416	2966187	41452354	14384951	39521107
	86270	17491563	2991953	41448449	14346028	39164607
	81490	17232022	2968618	41579053	14526333	39881031

Tabela F.7 - Tabela utilizada na construção da gama de trabalho do composto B(g,h,i)P

	Área dos picos			
	B(ghi)P 0,2 ppb	P.I.	B(ghi)P 10 ppb	P.I.
N=10	66465	31206954	3339136	30768615
	65986	30879567	3327695	30795226
	71582	30690298	3357383	30773419
	55205	30651618	3339785	30796202
	68311	30587921	3333428	30818712
	65732	30413244	3346895	30880113
	65923	30296849	3367197	30787643
	65527	30157057	3340440	31010450
	70371	29991505	3334761	30835957
	64702	31751648	3339273	30981260

Tabela F.8 - Tabela utilizada na construção da gama de trabalho do composto I(1,2,3-cd)P

	Área dos picos			
	I(123cd)P 0,9 ppb	P.I.	I(123cd)P 10 ppb	P.I.
N=10	44876	29138371	444844	27404015
	53926	29140870	449600	27706496
	57534	29034994	447949	27698536
	49258	29210118	449897	27662398
	62471	29139512	462109	27770831
	53262	29108537	453975	27876495
	64990	29044385	451670	27777696
	57305	28925572	446030	27961622
	51392	29064611	446678	27742208
	45518	29182238	460693	28013785

ANEXO G

Secção 4.3 – Resolução de Problemas

Tabela G.1 - Resumo de problemas, por ordem cronológica

Ocorrência	Descrição do problema	Resolução
Detetor de fluorescência	- Fuga de solvente no detetor	- Substituição da célula do detetor
Bombas	- Pressão muito baixa - Variação dos tempos de retenção - Não passou nos testes às bombas	- Substituição das válvulas e pistões das bombas
Injetor	- Os picos apresentavam áreas muito diferentes para a mesma concentração - Não passou nos testes ao injetor	- Substituição do injetor
Coluna	- Aumento gradual da pressão, ao longo de várias injeções	- Substituição da coluna
Bombas	- Grande diferença de pressões (DeltaPsi elevado) - Pressão muito baixa - Não passou nos testes às bombas	- Substituição das válvulas e pistões das bombas
Bombas	- Grande diferença de pressões (DeltaPsi elevado) - Não passou nos testes às bombas	- Substituição das válvulas e pistões das bombas - Substituição dos solventes por solventes filtrados por membrana 0.2um - Substituição da solução de lavagem Seal Wash por 100% metanol
Coluna	- Diminuição consecutiva da área do pico, a cada injeção - Variação dos tempos de retenção	- Troca por coluna não específica para PAH's
Coluna	- Coluna não pode ser usada por não ser própria para PAH's	- Troca para coluna de PAH's de outro fabricante
Lâmpada do detetor de fluorescência	- Ausência de picos a meio das injeções, apenas apresentando ruído	

De seguida apresentam-se os cromatogramas das injeções realizadas com cafeína, no detetor de díodos, para despiste do detetor de fluorescência.

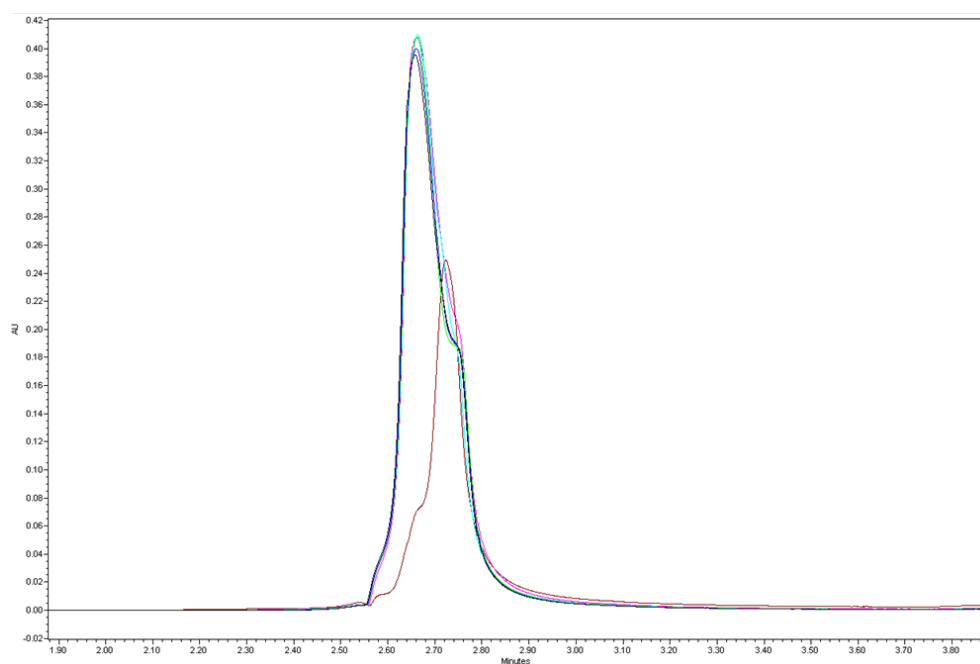


Figura G.1 - Cafeína 1,0 mL/min (coluna PAH's)

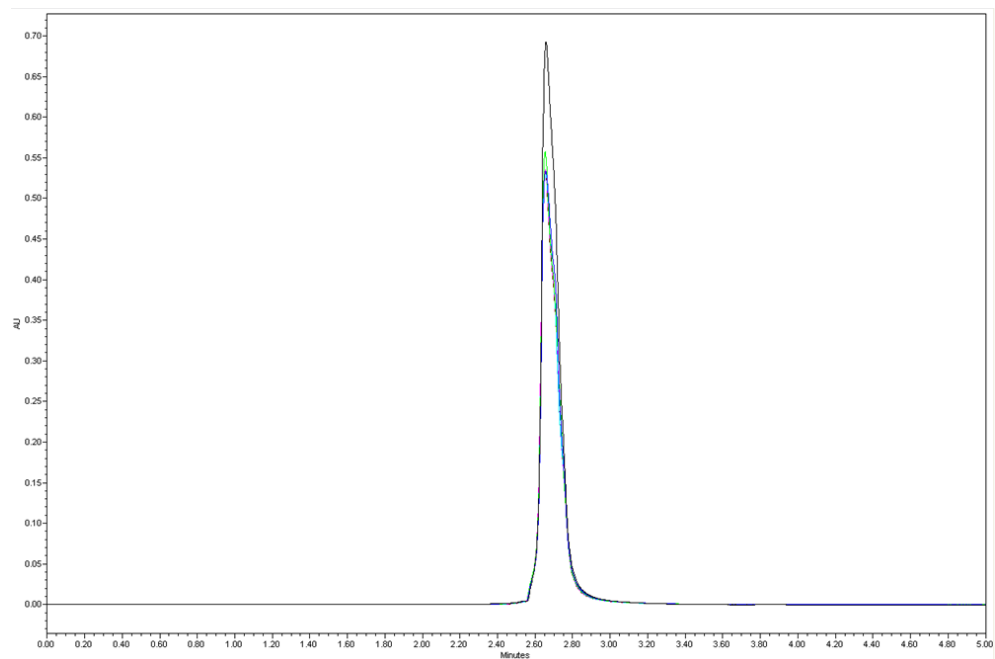


Figura G.2 - MeOH 1,0 mL/min (coluna PAH's)

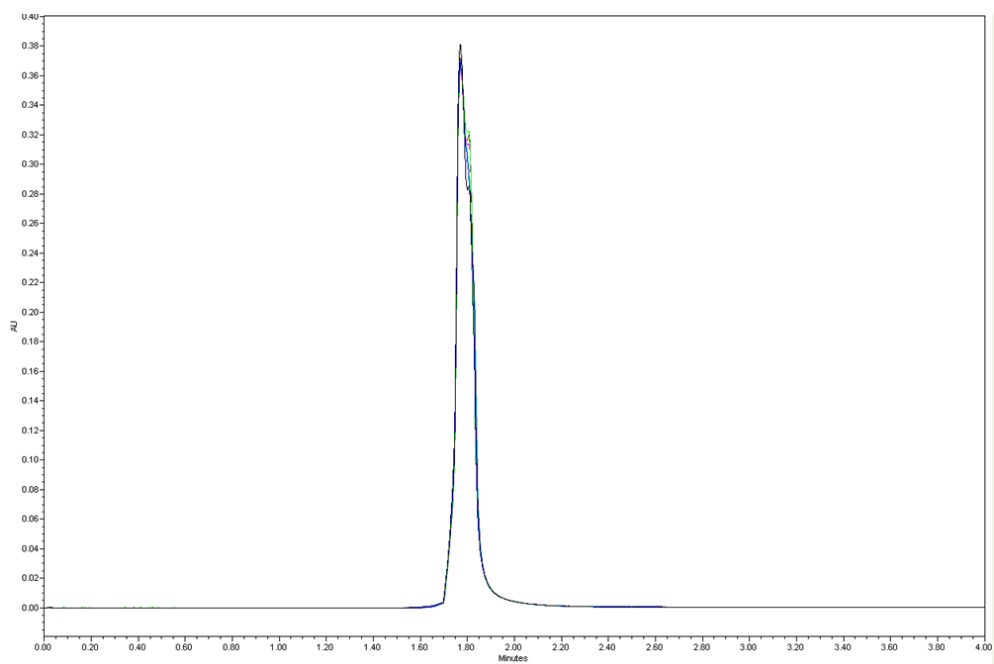


Figura G.3 - Cafeína 1,5 mL/min (coluna PAH's)

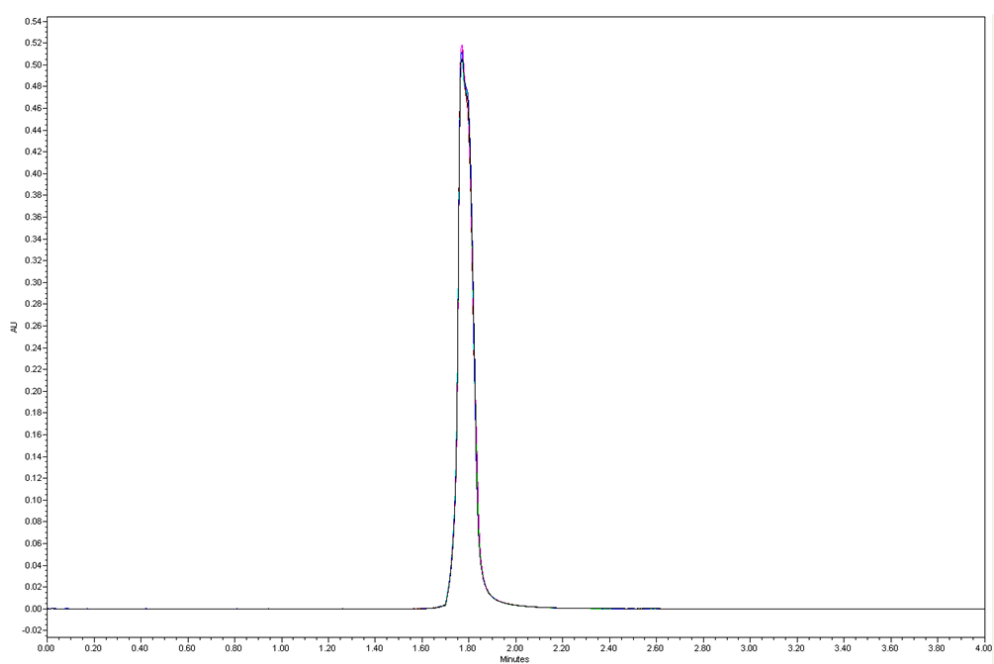


Figura G.4 - MeOH 1,5 mL/min (coluna PAH's)

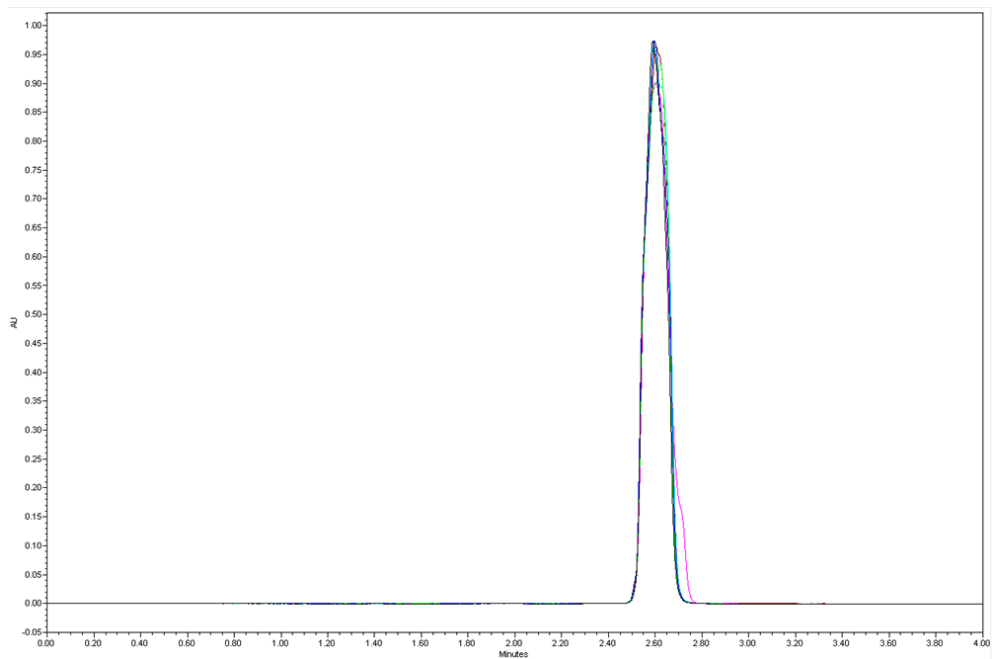


Figura G.5 - Cafeína 1,0 mL/min (coluna C18)

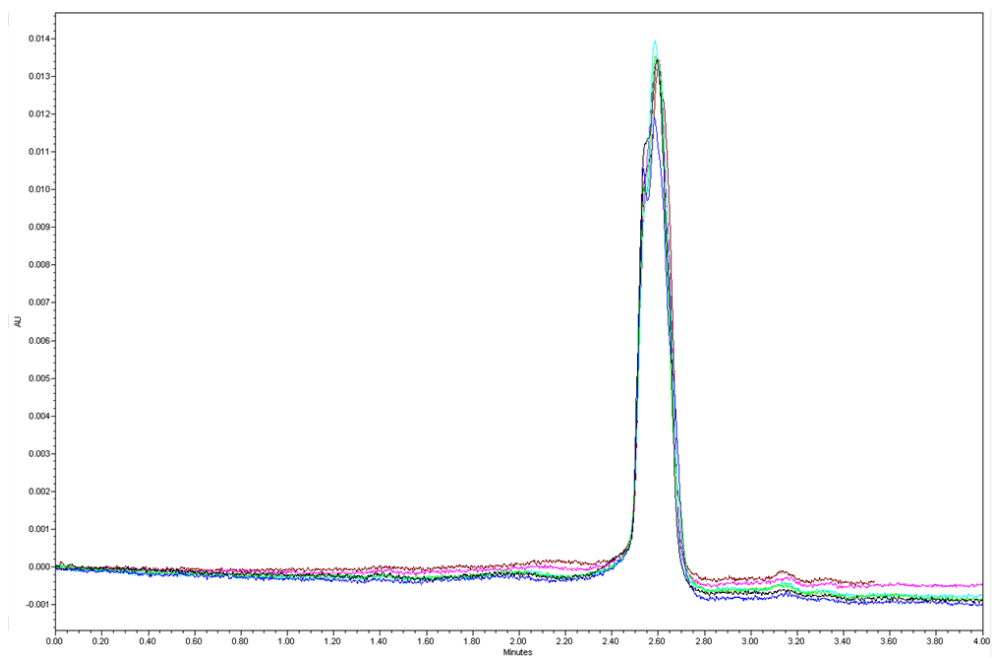


Figura G.6 - MeOH 1,0 mL/min (coluna C18)

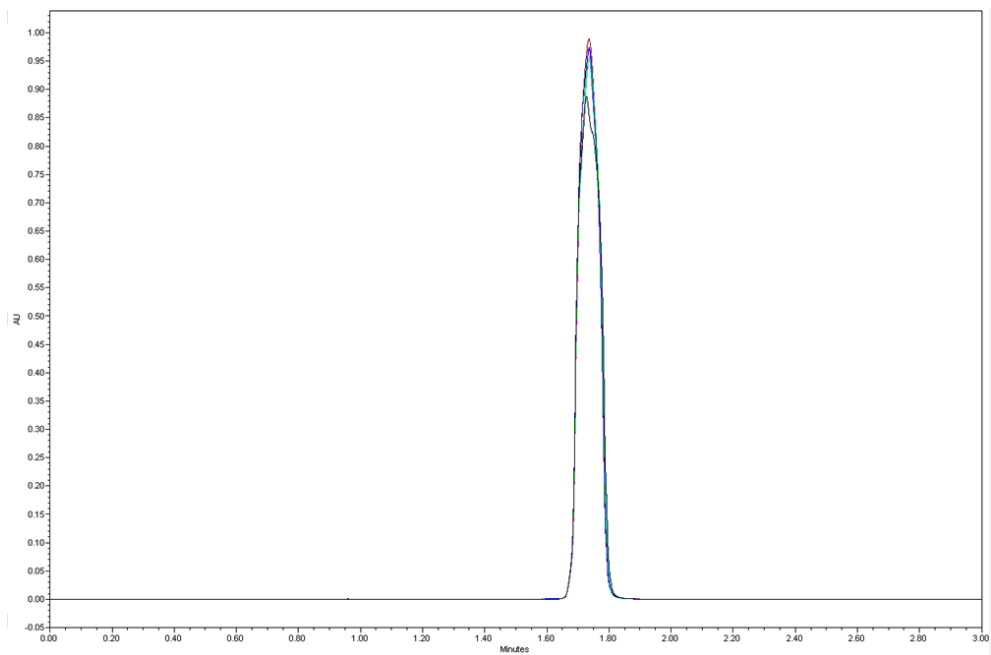


Figura G.7 - Cafeína 1,5 mL/min (coluna C18)

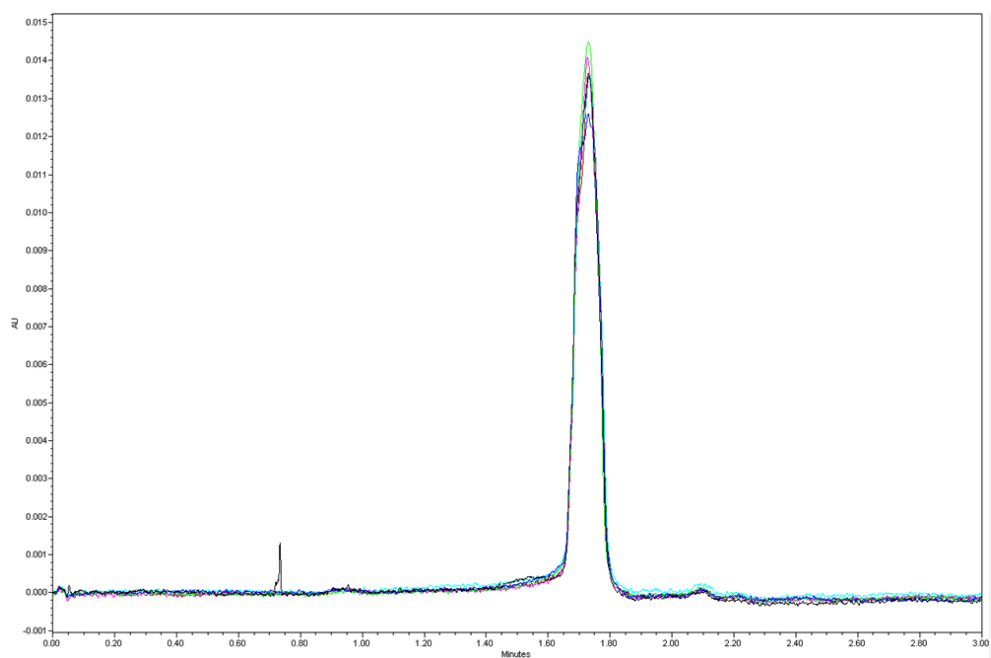


Figura G.8 - MeOH 1,5 mL/min (coluna C18)

Em relação aos *sets* de verificação, com padrão BaP referentes aos dados das tabelas 4.67, 4.68 e 4.69, apresentam-se os cromatogramas correspondentes.

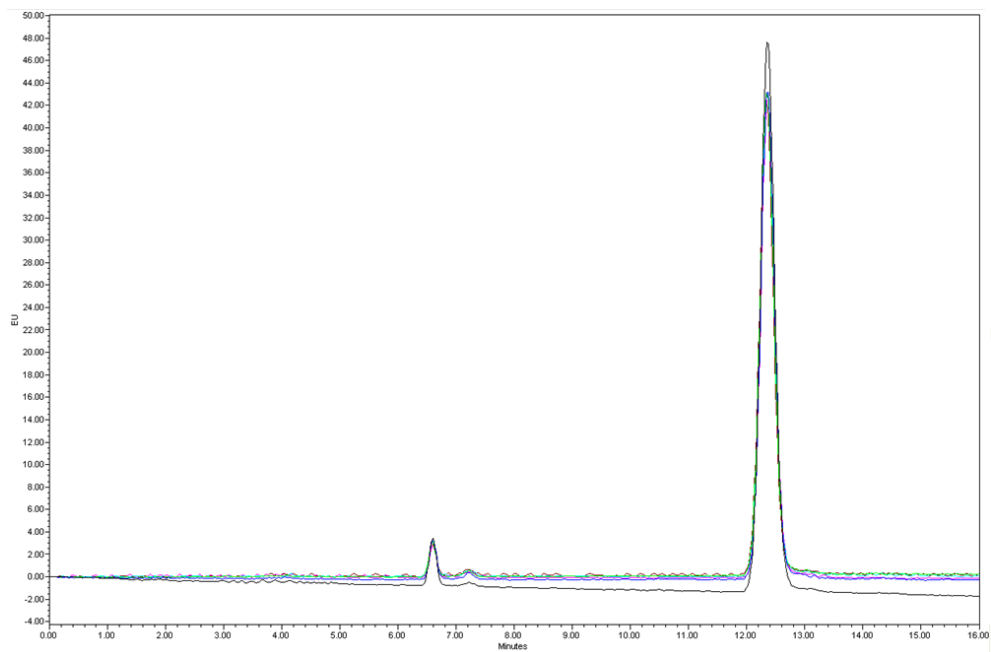


Figura G.9 - Injeções BaP referentes ao primeiro set (tabela 4.67)

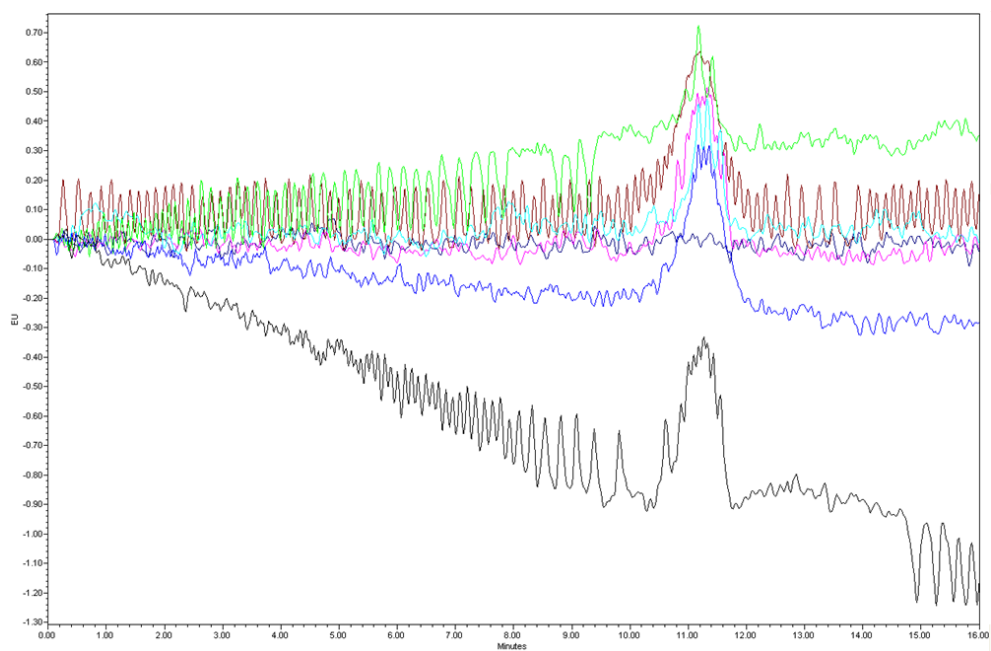


Figura G.10 - Injeções ACN intercaladas às injeções do primeiro set (tabela 4.67)

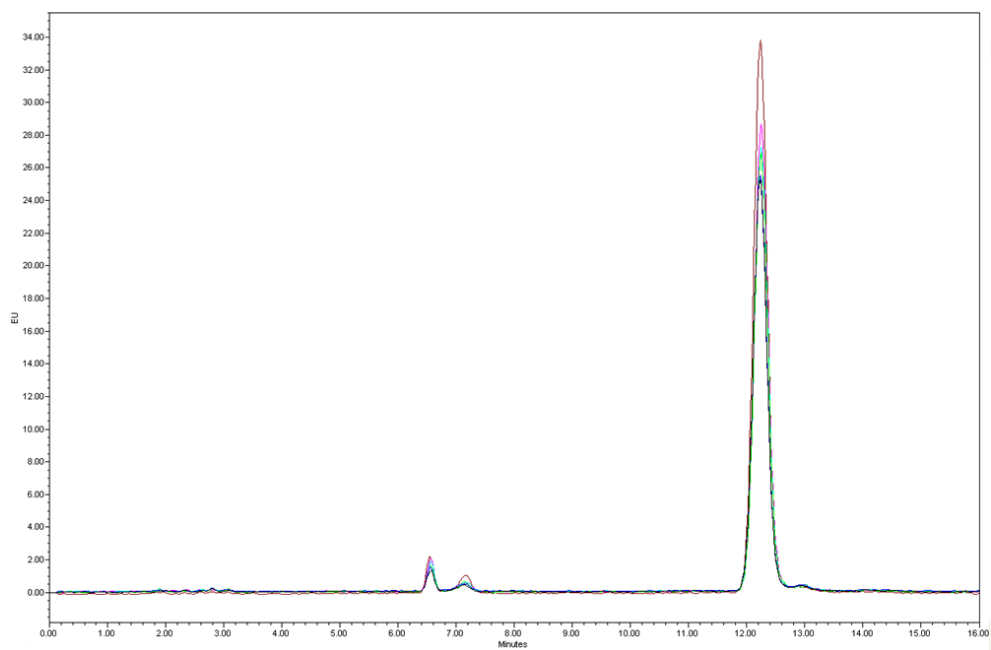


Figura G.11 - Injeções BaP referentes ao segundo *set* (tabela 4.68)

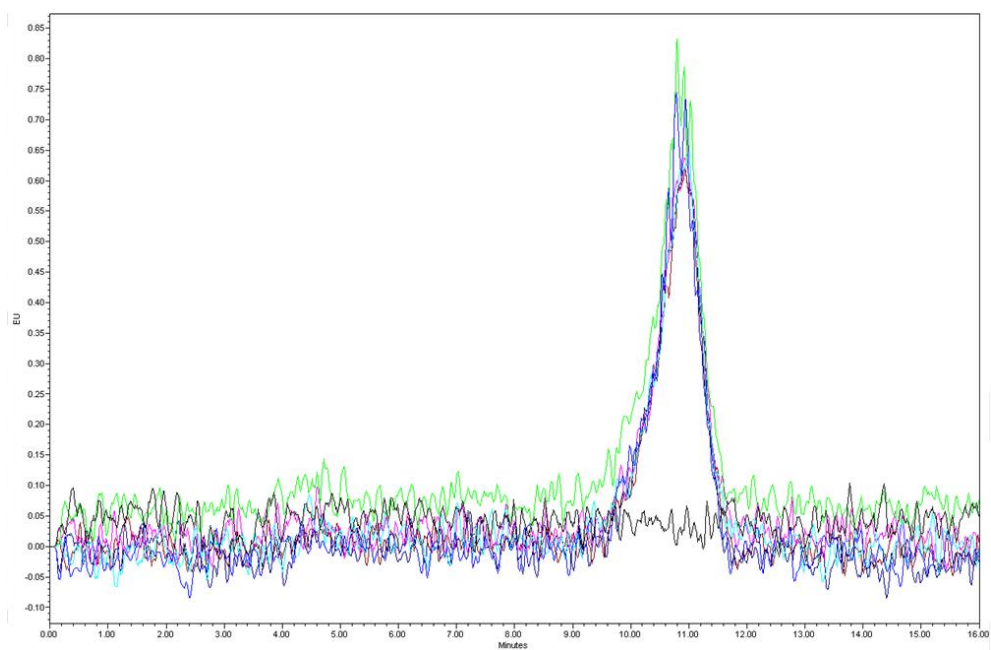


Figura G.12 - Injeções ACN intercaladas às injeções do segundo *set* (tabela 4.68)

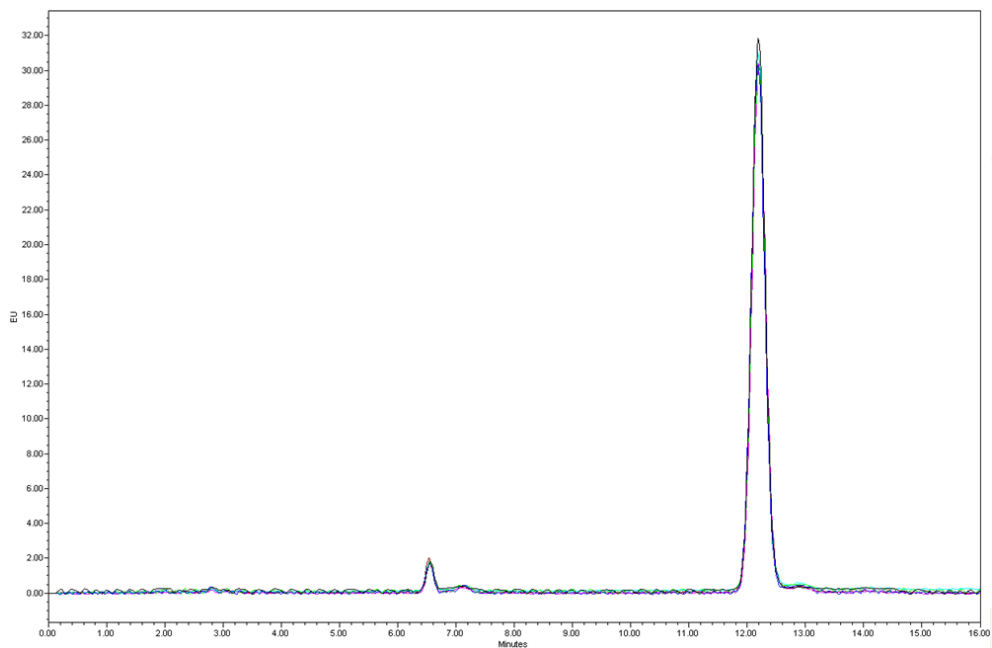


Figura G.13 - Injeções BaP referentes ao terceiro set (tabela 4.69)

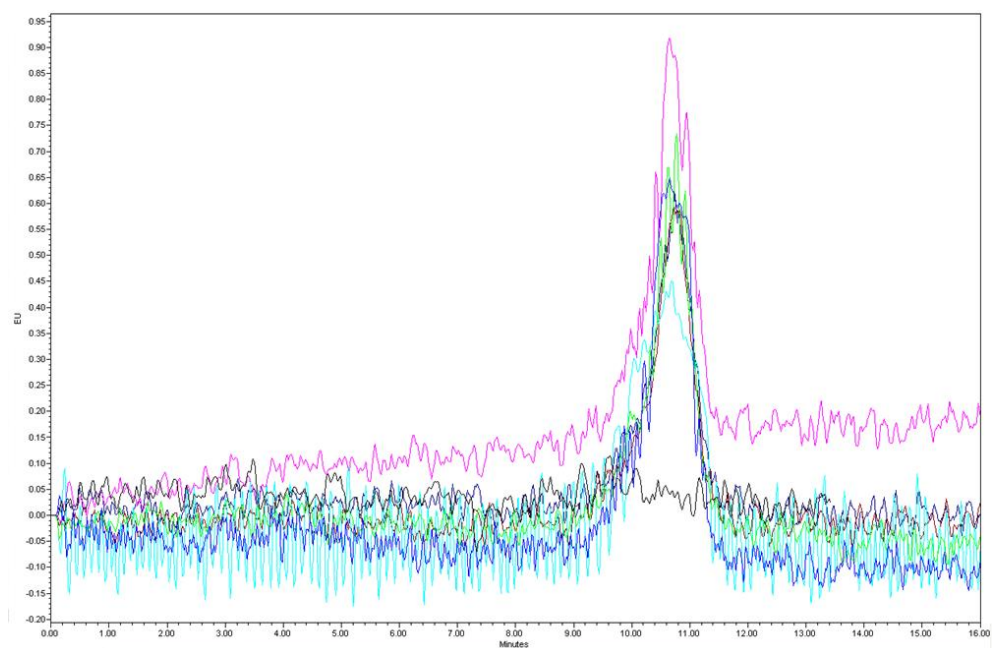


Figura G.14 - Injeções ACN intercaladas às injeções do terceiro set (tabela 4.69)

De seguida apresentam-se as tabelas referentes aos sets de verificação em relação ao último problema.

Tabela G.2 - Primeiro set de injeções de verificação

	Área do pico BaA/Área do pico P.I.	Área do pico CHR/Área do pico P.I.	Área do pico BbF/Área do pico P.I.	Área do pico BkF/Área do pico P.I.	Área do pico BaP/Área do pico P.I.	Área do pico Db(ah)A/Área do pico P.I.	Área do pico B(ghi)P/Área do pico P.I.	Área do pico I(123cd)P/Área do pico P.I.
	0,10913	0,39743	0,06627	0,72659	0,27150	0,39487	0,11358	0,01550
	0,15694	0,66007	0,11397	1,17152	0,15382	0,60375	0,11449	0,02314
	0,16222	0,69117	0,12650	1,21861	0,13406	0,62536	0,11247	0,02498
	0,18018	0,82271	0,14794	1,42107	0,11940	0,71402	0,11297	0,02661
	0,20345	1,00162	0,19365	1,71276	0,11642	0,82007	0,11466	0,02941
	0,21193	1,11853	0,21545	1,86550	0,11227	0,87056	0,10833	0,03226
Média	0,17064	0,78192	0,14396	1,35267	0,15125	0,67144	0,11275	0,02532
Desv.pad	0,03719	0,25852	0,05447	0,40990	0,06084	0,17132	0,00232	0,00579
RSD(%)	21,8	33,1	37,8	30,3	40,2	25,5	2,1	22,9

Tabela G.3 - Segundo set de injeções de verificação

	Área do pico BaA/Área do pico P.I.	Área do pico CHR/Área do pico P.I.	Área do pico BbF/Área do pico P.I.	Área do pico BkF/Área do pico P.I.	Área do pico BaP/Área do pico P.I.	Área do pico Db(ah)A/Área do pico P.I.	Área do pico B(ghi)P/Área do pico P.I.	Área do pico I(123cd)P/Área do pico P.I.
	0,23031	1,53226	0,27651	2,16400	0,11995	0,96787	0,10639	0,03494
	0,22921	1,55582	0,28096	2,18567	0,11498	0,97178	0,10340	0,03551
	0,23172	1,60679	0,28962	2,24181	0,10853	0,98181	0,10468	0,03455
	0,22859	1,60795	0,29322	2,24318	0,11106	0,98909	0,10120	0,03520
	0,22648	1,60187	0,29986	2,24916	0,10792	0,96046	0,09606	0,03438
	0,22844	1,59543	0,29982	2,26176	0,10714	0,99643	0,09937	0,03465
Média	0,22912	1,58335	0,29000	2,22426	0,11160	0,97791	0,10185	0,03487
Desv.pad	0,00178	0,03166	0,00968	0,03953	0,00499	0,01361	0,00377	0,00043
RSD(%)	0,8	2,0	3,3	1,8	4,5	1,4	3,7	1,2

Tabela G.4 - Terceiro set de injeções de verificação

	Área do pico BaA/Área do pico P.I.	Área do pico CHR/Área do pico P.I.	Área do pico BbF/Área do pico P.I.	Área do pico BkF/Área do pico P.I.	Área do pico BaP/Área do pico P.I.	Área do pico Db(ah)A/Área do pico P.I.	Área do pico B(ghi)P/Área do pico P.I.	Área do pico I(123cd)P/Área do pico P.I.
	0,21106	1,15194	0,27691	2,23675	0,09583	0,99009	0,09900	0,03571
	0,22624	1,24369	0,28546	2,24006	0,09124	1,00111	0,09704	0,03393
	0,22777	1,23649	0,28994	2,24766	0,09035	0,99962	0,09649	0,03751
	0,22577	1,21619	0,28021	2,22517	0,08714	0,99238	0,09818	0,03518
	0,22539	1,22245	0,28771	2,25190	0,08684	1,00365	0,09266	0,03608
	0,22761	1,23069	0,29097	2,27544	0,08704	1,01022	0,09310	0,03521
Média	0,22397	1,21691	0,28520	2,24616	0,08974	0,99951	0,09608	0,03561
Desv.pad	0,00640	0,03329	0,00558	0,01708	0,00353	0,00740	0,00263	0,00118
RSD(%)	2,9	2,7	2,0	0,8	3,9	0,7	2,7	3,3

Tabela G.5 - Quarto set de injeções de verificação

	Área do pico BaA/Área do pico P.I.	Área do pico CHR/Área do pico P.I.	Área do pico BbF/Área do pico P.I.	Área do pico BkF/Área do pico P.I.	Área do pico BaP/Área do pico P.I.	Área do pico Db(ah)A/Área do pico P.I.	Área do pico B(ghi)P/Área do pico P.I.	Área do pico I(123cd)P/Área do pico P.I.
	0,22520	1,35683	0,28706	2,31987	0,08753	1,01377	0,09356	0,03602
	0,22584	1,35311	0,28691	2,31181	0,08593	1,01326	0,09310	0,03740
	0,22872	1,35729	0,28811	2,30424	0,08500	1,01777	0,08994	0,03403
	0,22812	1,35871	0,29487	2,31853	0,08389	1,02344	0,09054	0,03567
	0,22689	1,34609	0,29082	2,32799	0,08238	1,02017	0,08975	0,03637
	0,23036	1,36332	0,29465	2,33248	0,08265	1,03135	0,09099	0,03631
Média	0,22752	1,35589	0,29040	2,31915	0,08456	1,01996	0,09131	0,03597
Desv.pad	0,00192	0,00583	0,00365	0,01032	0,00199	0,00678	0,00163	0,00111
RSD(%)	0,8	0,4	1,3	0,4	2,3	0,7	1,8	3,1

Tabela G.6 - Quinto set de injeções de verificação

	Área do pico BaA/Área do pico P.I.	Área do pico CHR/Área do pico P.I.	Área do pico BbF/Área do pico P.I.	Área do pico BkF/Área do pico P.I.	Área do pico BaP/Área do pico P.I.	Área do pico Db(ah)A/Área do pico P.I.	Área do pico B(ghi)P/Área do pico P.I.	Área do pico I(123cd)P/Área do pico P.I.
	0,22979	1,52986	0,30010	2,36107	0,08845	1,03456	0,09281	0,03542
	0,22970	1,52169	0,29559	2,36224	0,08625	1,03471	0,08936	0,03600
	0,22909	1,51319	0,29320	2,35627	0,08386	1,03427	0,09031	0,03630
	0,22780	1,50001	0,29503	2,34120	0,08482	1,03059	0,09003	0,03750
	0,22957	1,50489	0,29456	2,37035	0,08260	1,03058	0,09009	0,03532
	0,15551	1,02329	0,20158	1,60188	0,05567	0,70359	0,06260	0,02516
Média	0,21691	1,43215	0,28001	2,23217	0,08027	0,97805	0,08587	0,03428
Desv.pad	0,03009	0,20059	0,03850	0,30893	0,01222	0,13447	0,01146	0,00454
RSD(%)	13,9	14,0	13,7	13,8	15,2	13,7	13,3	13,2

Tabela G.7 - Sexto set de injeções de verificação

	Área do pico BaA/Área do pico P.I.	Área do pico CHR/Área do pico P.I.	Área do pico BbF/Área do pico P.I.	Área do pico BkF/Área do pico P.I.	Área do pico BaP/Área do pico P.I.	Área do pico Db(ah)A/Área do pico P.I.	Área do pico B(ghi)P/Área do pico P.I.	Área do pico I(123cd)P/Área do pico P.I.
	0,22202	1,14902	0,27284	2,28432	0,08128	1,01665	0,09045	0,03429
	0,23123	1,19872	0,28933	2,33875	0,07714	1,03791	0,08633	0,03531
	0,22849	1,19417	0,28295	2,34710	0,07027	1,02781	0,08880	0,03426
	0,23116	1,19700	0,28374	2,32920	0,07277	1,03710	0,08556	0,03597
	0,23101	1,20351	0,28640	2,35012	0,07687	1,04074	0,08686	0,03847
	0,23065	1,20008	0,28360	2,33881	0,07206	1,03773	0,08711	0,03717
Média	0,22909	1,19041	0,28314	2,33138	0,07507	1,03299	0,08752	0,03591
Desv.pad	0,00361	0,02052	0,00558	0,02420	0,00409	0,00914	0,00179	0,00166
RSD(%)	1,6	1,7	2,0	1,0	5,4	0,9	2,0	4,6

Tabela G.8 - Sétimo set de injeções de verificação

	Área do pico BaA/Área do pico P.I.	Área do pico CHR/Área do pico P.I.	Área do pico BbF/Área do pico P.I.	Área do pico BkF/Área do pico P.I.	Área do pico BaP/Área do pico P.I.	Área do pico Db(ah)A/Área do pico P.I.	Área do pico B(ghi)P/Área do pico P.I.	Área do pico I(123cd)P/Área do pico P.I.
	0,17677	0,84400	0,17288	1,55577	0,10912	0,72531	0,08886	0,02783
	0,21955	1,20880	0,26206	2,16713	0,07171	0,95820	0,08803	0,03536
	0,24079	1,51083	0,33395	2,55245	0,07644	1,07061	0,08274	0,03567
	0,24198	1,59255	0,35287	2,63225	0,07710	1,08826	0,08114	0,03937
	0,24816	1,66362	0,36814	2,71860	0,07721	1,11259	0,08624	0,04067
	0,24736	1,68704	0,37497	2,74623	0,07828	1,11543	0,08194	0,03918
Média	0,22910	1,41781	0,31081	2,39540	0,08164	1,01173	0,08482	0,03635
Desv.pad	0,02767	0,33016	0,07888	0,46160	0,01365	0,15176	0,00331	0,00469
RSD(%)	12,1	23,3	25,4	19,3	16,7	15,0	3,9	12,9

Tabela G.9 - Oitavo set de injeções de verificação

	Área do pico BaA/Área do pico P.I.	Área do pico CHR/Área do pico P.I.	Área do pico BbF/Área do pico P.I.	Área do pico BkF/Área do pico P.I.	Área do pico BaP/Área do pico P.I.	Área do pico Db(ah)A/Área do pico P.I.	Área do pico B(ghi)P/Área do pico P.I.	Área do pico I(123cd)P/Área do pico P.I.
	0,24663	1,90640	0,38308	2,77454	0,08221	1,12382	0,08354	0,03918
	0,25067	1,92198	0,38644	2,80919	0,07620	1,13335	0,07896	0,03867
	0,24758	1,90165	0,37826	2,79513	0,07548	1,13380	0,08302	0,03874
	0,24939	1,89505	0,38004	2,79010	0,07542	1,13545	0,07798	0,03821
	0,24891	1,86582	0,37523	2,77297	0,07387	1,13205	0,07913	0,04009
	0,24796	1,85522	0,37082	2,76584	0,07483	1,13394	0,07775	0,03780
Média	0,24852	1,89102	0,37898	2,78463	0,07633	1,13207	0,08006	0,03878
Desv.pad	0,00144	0,02546	0,00556	0,01634	0,00298	0,00419	0,00256	0,00079
RSD(%)	0,58	1,35	1,47	0,59	3,90	0,37	3,19	2,05

Tabela G.10 - Nono set de injeções de verificação

	Área do pico BaA/Área do pico P.I.	Área do pico CHR/Área do pico P.I.	Área do pico BbF/Área do pico P.I.	Área do pico BkF/Área do pico P.I.	Área do pico BaP/Área do pico P.I.	Área do pico Db(ah)A/Área do pico P.I.	Área do pico B(ghi)P/Área do pico P.I.	Área do pico I(123cd)P/Área do pico P.I.
	0,24450	1,40668	0,34956	2,66152	0,07008	1,13170	0,08006	0,03904
	0,24796	1,44234	0,35794	2,70810	0,06567	1,14181	0,07687	0,04036
	0,24851	1,44827	0,35534	2,71338	0,06389	1,14234	0,07865	0,04089
	0,24871	1,45214	0,36033	2,71900	0,06215	1,14453	0,07947	0,04014
	0,24705	1,43679	0,34993	2,70505	0,06203	1,14096	0,07988	0,03951
	0,24883	1,43583	0,35032	2,70698	0,06308	1,13942	0,07858	0,03991
Média	0,24759	1,43701	0,35391	2,70234	0,06448	1,14013	0,07892	0,03997
Desv.pad	0,00165	0,01616	0,00463	0,02063	0,00305	0,00446	0,00117	0,00065
RSD(%)	0,7	1,1	1,3	0,8	4,7	0,4	1,5	1,6

Tabela G.11 - Décimo set de injeções de verificação

	Área do pico BaA/Área do pico P.I.	Área do pico CHR/Área do pico P.I.	Área do pico BbF/Área do pico P.I.	Área do pico BkF/Área do pico P.I.	Área do pico BaP/Área do pico P.I.	Área do pico Db(ah)A/Área do pico P.I.	Área do pico B(ghi)P/Área do pico P.I.	Área do pico I(123cd)P/Área do pico P.I.
	0,24145	1,50475	0,33218	2,59995	0,06801	1,11592	0,08225	0,04099
	0,24585	1,56199	0,35176	2,67494	0,06329	1,13359	0,07931	0,04092
	0,24776	1,57557	0,35124	2,70686	0,06266	1,13736	0,07968	0,04136
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	0,24502	1,54744	0,34506	2,66058	0,06465	1,12896	0,08041	0,04109
Desv.pad	0,00324	0,03759	0,01115	0,05488	0,00292	0,01145	0,00160	0,00023
RSD(%)	1,3	2,4	3,2	2,1	4,5	1,0	2,0	0,6

Tabela G.12 - Décimo-primeiro set de injeções de verificação

	Área do pico BaA/Área do pico P.I.	Área do pico CHR/Área do pico P.I.	Área do pico BbF/Área do pico P.I.	Área do pico BkF/Área do pico P.I.	Área do pico BaP/Área do pico P.I.	Área do pico Db(ah)A/Área do pico P.I.	Área do pico B(ghi)P/Área do pico P.I.	Área do pico I(123cd)P/Área do pico P.I.
	0,23375	1,58583	0,32755	2,53651	0,07309	1,07532	0,08969	0,03498
	0,24329	1,70887	0,35208	2,67094	0,06644	1,10888	0,08492	0,03979
	0,24193	1,71060	0,35213	2,67384	0,06578	1,11130	0,07758	0,03823
	0,24084	1,71134	0,35468	2,67789	0,06477	1,10913	0,07845	0,03972
	0,23957	1,68718	0,35227	2,65712	0,06235	1,10810	0,07722	0,03854
	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	0,23988	1,68076	0,34774	2,64326	0,06649	1,10254	0,08157	0,03825
Desv.pad	0,00369	0,05401	0,01134	0,06018	0,00400	0,01526	0,00552	0,00196
RSD(%)	1,5	3,2	3,3	2,3	6,0	1,4	6,8	5,1

Tabela G.13 - Décimo-segundo set de injeções de verificação

	Área do pico BaA/Área do pico P.I.	Área do pico CHR/Área do pico P.I.	Área do pico BbF/Área do pico P.I.	Área do pico BkF/Área do pico P.I.	Área do pico BaP/Área do pico P.I.	Área do pico Db(ah)A/Área do pico P.I.	Área do pico B(ghi)P/Área do pico P.I.	Área do pico I(123cd)P/Área do pico P.I.
	0,23499	1,29988	0,32979	2,56320	0,06461	1,09187	0,07727	0,03795
	0,24116	1,35372	0,34188	2,63056	0,06031	1,10816	0,08270	0,03839
	0,24305	1,37852	0,34636	2,66877	0,06016	1,11749	0,07911	0,03843
	0,24547	1,38625	0,35058	2,68179	0,05901	1,11450	0,08051	0,04041
	0,24285	1,39405	0,35178	2,68913	0,05852	1,12271	0,07695	0,04066
	0,24789	1,45464	0,36778	2,77356	0,06745	1,14459	0,07637	0,04041
Média	0,24257	1,37784	0,34803	2,66783	0,06168	1,11655	0,07882	0,03937
Desv.pad	0,00439	0,05078	0,01252	0,06952	0,00356	0,01737	0,00245	0,00124
RSD(%)	1,8	3,7	3,6	2,6	5,8	1,6	3,1	3,1

Tabela G.14 - Décimo-terceiro set de injeções de verificação

	Área do pico BaA/Área do pico P.I.	Área do pico CHR/Área do pico P.I.	Área do pico BbF/Área do pico P.I.	Área do pico BkF/Área do pico P.I.	Área do pico BaP/Área do pico P.I.	Área do pico Db(ah)A/Área do pico P.I.	Área do pico B(ghi)P/Área do pico P.I.	Área do pico I(123cd)P/Área do pico P.I.
	0,22605	1,47160	0,29121	2,38183	0,10291	1,00941	0,08362	0,03898
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	-	-	-	-	-	-	-	-
Desv.pad	-	-	-	-	-	-	-	-
RSD(%)	-	-	-	-	-	-	-	-